

UNTERSUCHUNG
DER STROMINGER-THEORIE
AM BEISPIEL
DER (5R, 6R)-2,6-DIMETHYL-
6-PHENOXYACETAMIDOPENEM-
3-CARBONSÄURE

Ursula Geywitz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0017

UNTERSUCHUNG DER STROMINGER-THEORIE AM BEISPIEL
DER (5R, 6R)-2,6-DIMETHYL-6-PHENOXYACETAMIDOPENEM-
3-CARBONSÄURE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ursula Geywitz
aus Trostberg

1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-R. Pfaendler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Gompper

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1986

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Vorschlag und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. H.-R. Pfaendler
im Institut für Organische Chemie der Universität München
von November 1982 bis November 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Pfaendler danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und der Niederschrift dieser Arbeit und für die ständige Bereitschaft zu hilfreicher Diskussion.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Huber für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Lösung apparativer Probleme sowie den Damen des physikalischen Labors für rasche und zuverlässige Anfertigung der Spektren. Ferner danke ich Frau Schwarz und Herrn Schulz für die Anfertigung der Elementaranalysen.

Außerordentlich verbunden bin ich meinen Kollegen im Arbeitskreis für ihre mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Geschichte der Chemotherapeutika und Entdeckung des Penicillins	1
1.2. Wirkung der klassischen β -Lactam- antibiotika auf Bakterien	3
1.2.1. Penicilline	3
1.2.2. Cephalosporine	4
1.3. Problem der Antibiotikumre- sistenz	5
1.4. Bedeutung der Antibiotika	8
 <u>2. Wirkungsmechanismus der β-Lactamantibiotika</u> ..	 9
2.1. Aufbau der Bakterienzellwände	9
2.2. Angriff der β -Lactamantibiotika nach der Theorie von Strominger	12
2.3. Auswirkungen auf die Morphologie der Bakterienzelle	15

	Seite
<u>3. Stabilität und biologische Aktivität unter-</u> <u>schiedlicher β-Lactamantibiotika</u>	16
3.1. Einfluß der "Stickstoffpyramide" im β -Lactamgerüst	16
3.2. Einfluß der Enaminresonanz	17
3.3. Einfluß der Seitenketten	19
3.3.1. Stabilität gegenüber der Metaboli- sierung im Körper	19
3.3.2. Einführung von 6β -Substituenten	19
3.3.3. Serumbindung der β -Lactam- antibiotika	20
<u>4. Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbezie-</u> <u>hung nach den Theorien von Strominger</u>	21
4.1. Untersuchungen am Penemsystem	21
4.1.1. Beziehung zwischen chemischer Sta- bilität und bakteriologischer Aktivität bei Penemen	21
4.1.2. Auswahl des geeigneten Test- systems	24

	Seite
4.1.3. Optimierte Synthesen der Penem- systeme	25
4.1.3.1. Synthese der (5R, 6R)-2,6-Dime- thyl-6-phenoxyacetamidopenem-3- carbonsäure (<u>28</u>)	25
4.1.3.2. Synthese der (5R, 6R)-2-Methyl- 6-phenoxyacetamidopenem-3-car- bonsäure als Vergleichssubstanz	37
4.1.4. Ergebnisse der kinetischen Messungen	44
4.1.5. Ergebnisse der bakteriologi- schen Tests	45
4.1.6. Bestimmung der Minimalen Hemmkon- zentrationen (MHK)	49
4.1.7. Test auf β -Lactamaseinhibitor- fähigkeit von <u>28</u>	53
4.2. Monobactamsynthese aus (6R)-6- Amino-6-methylpenicillansäure- methylester (<u>12</u>)	56
4.2.1. Die neue Klasse der Monobactame	56
4.2.2. Synthese des (3R)-3-Benzoxycarbo- nylamino-3-methylazetidin-2- ons (<u>52</u>)	58

	Seite
<u>5. Ausblick</u>	63
 <u>Experimenteller Teil</u>	
 <u>6. Allgemeines</u>	 64
6.1. Physikalische Meßgeräte	64
6.2. Lösungsmittel	65
6.3. Präparative Methodik	65
6.4. Chromatographische Verfahren	66
6.5. Kinetikmessungen	66
6.5.1. Herstellung des Phosphat- puffers	66
6.5.2. Kinetikmessung und Bestimmung der Halbwertszeit	67
6.6 Herkunft der eingesetzten Che- mikalien	67
6.7. Bakterielle Tests	68
6.7.1. Verwendetes Material	68
6.7.2. Test-Durchführung	69
6.7.2.1. Test auf antibakterielle Aktivität	69

	Seite
6.7.2.2. Bestimmung der MHK-Werte	69
<u>7. Synthese wichtiger Ausgangsmaterialien</u>	<u>70</u>
7.1. Weinsäure-di-p-nitrobenzylester	70
7.2. Fumarsäure-di-p-nitrobenzyl- ester	71
7.3. 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure- p-nitrobenzylester	71
7.3.1. Herstellung aus Weinsäure-di- p-nitrobenzylester	71
7.3.2. Herstellung durch Ozonolyse des Fumarsäure-di-p-nitrobenzylesters	72
7.4. Diazomethan	73
7.5. Phenoxyessigsäurechlorid	73
<u>8. Synthese der (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxy- acetamidopenem-3-carbonsäure (28)</u>	<u>74</u>
8.1. 6-Benzylidenaminopenicillansäure	74
8.2. 6-Benzylidenaminopenicillansäure- methylester (<u>9</u>)	75

	Seite
8.3. (6R)-6-Benzylidenamino-6-methylpenicillansäuremethylester (<u>10</u>)	77
8.4. (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (<u>12</u>)	78
8.5. (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester (<u>13</u>)	80
8.6. Zwei isomere (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-oxide (<u>14 a/b</u>)	81
8.7. (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-dioxid	84
8.8. (2R)-2-[(1R, 5R)-4,7-Diaza-5-methyl-6-oxo-3-phenoxy-methyl-2-thia-bicyclo-[3.2.0] hept-3-enyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (<u>18</u>)	85
8.9. (2R)-2-[(3R,4R)-4-Acetoxy-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (<u>17</u>) ..	86
8.10. (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (<u>16</u>)	87

8.11.	2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethyl ester (<u>19</u>)	89
8.12.	2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (<u>20</u>)	90
8.13.	(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on (<u>21</u>)	91
8.14.	Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (<u>24 a/b</u>)	93
8.15.	Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (<u>25 a/b</u>)	94
8.15.1.	Reaktion mit Thionylchlorid und Poly-Hünigbase	94
8.15.2.	Reaktion mit Thionylchlorid und Triethylamin	95

8.16.	2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl- 3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl] - 2-triphenylphosphoranylidenessig- säure-p-nitrobenzylester (<u>26</u>)	97
8.17.	(5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxy- acetamidopenem-3-carbonsäure- p-nitrobenzylester (<u>27</u>)	99
8.18.	Kaliumsalz der (5R, 6R)-2,6-Di- methyl-6-phenoxyacetamidopenem- 3-carbonsäure (<u>28</u>)	100

9.	<u>Synthese der (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxy- acetamidopenem-3-carbonsäure (<u>40</u>) als Vergleichssubstanz</u>	102
----	--	-----

9.1.	6-Phenoxyacetamidopenicillan- säure- β -S-oxid (<u>29</u>)	102
9.2	6-Phenoxyacetamidopenicillan- säuremethylester- β -S-oxid (<u>30</u>)	103
9.3.	(2R)-2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3- phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl] - 3-methylbut-3-ensäuremethylester (<u>31</u>) ..	104

9.4.	2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxy- acetamidoazetidin-2-onyl] -3-methyl- but-2-ensäuremethylester (<u>32</u>)	105
9.5.	2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phen- oxyacetamidoazetidin-2-onyl] -2- oxoessigsäuremethylester (<u>33</u>)	106
9.6.	(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxy- acetamidoazetidin-2-on (<u>34</u>)	108
9.7.	Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio- 3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl] - 2-hydroxyessigsäure-p-nitroben- zylester (<u>36 a/b</u>)	109
9.8.	Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio- 3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl] - 2-chloressigsäure-p-nitrobenzyl- ester (<u>37 a/b</u>)	110
9.9	2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phen- oxyacetamidoazetidin-2-onyl] -2- triphenylphosphoranylidenessig- säure-p-nitrobenzylester (<u>38</u>)	111
9.10.	(5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacet- amidopenem-3-carbonsäure-p-ni- trobenzylester (<u>39</u>)	112

9.11.	Kaliumsalz der (5R, 6R)-2-Methyl- 6-phenoxyacetamidopenem-3-car- bonsäure (<u>40</u>)	113
-------	---	-----

10.	<u>Monobactamsynthese aus (6R)-6-Amino-6- methylpenicillansäuremethylester (12)</u>	115
-----	---	-----

10.1	N,N'-Di- [(2R, 5R, 6R)-1-aza-2- carboxymethyl-4-thia-3,3,6- trimethylbicyclo [3.2.0] heptyl]- harnstoff (<u>45</u>)	115
------	--	-----

10.2.	(6R)-6-Benzoxycarbonylamino- 6-methylpenicillansäuremethyl- ester (<u>46</u>)	116
-------	---	-----

10.3.	(6R)-6-Benzoxycarbonylamino- 6-methylpenicillansäuremethyl- ester-S-dioxid (<u>47</u>)	118
-------	--	-----

10.4.	2- [(3R, 4R)-3-Benzoxycarbonyl- amino-3-methyl-4-methylsulfonyl- azetidin-2-onyl] -2-methylbut-2- ensäuremethylester (<u>49</u>)	119
-------	---	-----

10.5.	(3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino- 3-methyl-4-methylsulfonylazeti- din-2-on (<u>51</u>)	120
-------	---	-----

	Seite
10.6. (3R)-3-Benzoxycarbonylamino- 3-methylazetidin-2-on (<u>52</u>)	122
<u>11. Zusammenfassung</u>	124
<u>12. Literaturverzeichnis</u>	125

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Chemotherapeutika und Entdeckung des Penicillins

Penicillin ist vielleicht das berühmteste, aber lange nicht das erste Chemotherapeutikum, das entdeckt wurde. Bereits im ausgehenden 19. Jahrhundert fanden Ärzte Stoffe, mit denen sich durch Mikroorganismen hervorgerufene Krankheiten bekämpfen ließen: Chinarindenextrakte gegen Malaria auslösende Plasmodium-Einzeller, Quecksilberverbindungen gegen den Syphilis-Erreger *Treponema pallidum*, Ipecacuana gegen Ruhr-Amöben. Diese Epoche, in der sich die Suche nach den Chemotherapeutika noch recht unsystematisch gestaltete, nennen Medizinhistoriker das "Altertum der Chemotherapie".

Erst mit dem Serologen Paul Ehrlich brach in den ersten Jahren des 20. Jahrhunderts das "Mittelalter der Chemotherapie" an. Er begann gezielt und systematisch in großangelegten Tierversuchen nach Substanzen zu fahnden, die seine hochgesteckte Forderung erfüllten: Ein Chemotherapeutikum darf nur den Krankheitserreger zerstören, die Zellen des erkrankten Organismus jedoch nicht angreifen. So entdeckte er das Salvarsan, mit dem die Syphilis geheilt werden konnte. 1935 erkannte der Pathologe und Bakteriologe Gerhard Domagk die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide gegen Staphylococcen, Streptococcen und Coli-Bakterien. Trotz all dieser Erfolge hielt man

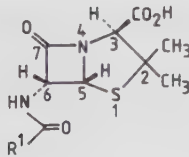
aber noch keine Waffe gegen die übrigen bakteriellen Krankheitserregern in Händen ¹⁾.

Mit einem Paukenschlag begann die "Neuzeit der Chemotherapie" durch die Zufallsentdeckung des Alexander Fleming im Jahre 1928. Das Penicillin war gefunden. Eigentlich war es eher eine Wiederentdeckung. Bereits ein altes irisches Hausrezept besagte: "Bestreiche eine Scheibe Brot mit Butter. Halte sie einige Tage feucht und warm. Berechte aus der sich bildenden grünen Schimmelschicht eine Paste. Besteiche damit schwärende Wunden." In der Medical School des St. Mary's Hospital in London hatte Fleming monatelang Staphylococcenkulturen gezüchtet. Sie gehören zu den eitererregenden Bakterien und sind vor allem in Lebensmitteln anzutreffen. Auf einer in einem Winkel des Labors vergessenen Petrischale hatte sich eine Pilzspore des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* eingenistet. Daß rund um den Schimmelpilz keine einzige Staphylococce zu sehen war, erregte die Aufmerksamkeit Flemings. Er untersuchte dieses Phänomen und entdeckte, daß ein Stoffwechselprodukt des *Penicillium notatum* dafür verantwortlich war. Er nannte es Penicillin ¹⁾.

1.2. Wirkung der klassischen β -Lactamantibiotika auf Bakterien

1.2.1. Penicilline

Fleming begann nun diese neue "Wunderdroge" genauer zu untersuchen und es gelang ihm, die hohe Wirksamkeit dieser Substanz gegen mehrere Arten grampositiver Erreger, wie z. B. Staphylococcen, Streptococcen und Pneumococcen, nachzuweisen. Leider erwies sich das Penicillin gegen sogenannte gramnegative Bakterien, wie z. B. *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* und gegen den Problemkeim *Pseudomonas aeruginosa*, als unwirksam.



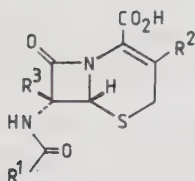
Grundgerüst der Penicilline

Im Jahre 1848 entwickelte der dänische Bakteriologe Hans Christian Joachim Gram ein Anfärbeverfahren, das eine Unterscheidung verschiedener Bakterienarten zuläßt. Bei den Stämmen, die sich anfärben lassen, spricht man von grampositiven,

bei denen eine Färbung nicht gelingt, von gramnegativen Bakterien. Dieses Färbeverhalten beruht auf einem unterschiedlichen Zellwandaufbau der einzelnen Bakterienstämme. Während die Zellwand des grampositiven Bakteriums im Wesentlichen einschichtig und damit gut passierbar für viele Wirkstoffe ist, besteht die Zellwand des gramnegativen Bakteriums aus mehreren Schichten. Diese können nur schwer durchdrungen werden, am besten noch von relativ unpolaren Wirkstoffen ^{2) 3) 4)}. Durch Synthese und Evaluation tausender Penicillinderivate haben es Chemiker und Biologen geschafft, die Wirksamkeit dieser Stoffklasse zu verbessern. Moderne Penicilline, wie z. B. das Piperacillin und das Mezlocillin, sind auch hochwirksam gegen gramnegative Bakterien. Ein Nachteil der Penicilline darf allerdings nicht verschwiegen werden. Trotz seiner geringen Giftigkeit ist beispielsweise Penicillin G eines der stärksten Allergene im Tierversuch und auch bei vielen Menschen treten Unverträglichkeiten in Form von Allergien auf.

1.2.2. Cephalosporine

Nicht weniger bedeutend als die Entdeckung von Fleming war die Isolierung des Cephalosporins C durch Brotzu ²⁾ aus einem Cephalosporium acremonium-Stamm im Jahre 1945. Die Strukturaufklärung durch Newton und Abraham im Jahre 1953 zeigte das Grundgerüst einer neuen Antibiotikumklasse.



Grundgerüst der Cephalosporine

Durch Weiterentwicklungen am Cephalosporingerüst erhielt der Arzt eine Waffe, die auch gegen gramnegative Keime, wie Proteus-, Escherichia coli-, Klebsiella- und Enterobacter-, sowie Pseudomonasstämmen, wirkungsvoll eingesetzt werden konnte. Cephalosporinantibiotika besitzen eine hervorragende Stabilität gegen β -Lactamasen (siehe 1.3.) und gleichzeitig auch die für Penicillin charakteristische geringe Giftigkeit. Weit seltener als bei den Penicillinen beobachtet man Allergien gegenüber Cephalosporinantibiotika.

1.3. Problem der Antibiotikaresistenz

Obwohl die mehrschichtige Zellwand gramnegativer Bakterien mit vielen Proteinkanälen durchwirkt ist, bildet sie für viele Wirkstoffe eine unüberwindbare Schranke ⁵⁾. Infektionen, die durch solche Keime verursacht werden, sind jedoch nicht

nur deswegen gefürchtet. Versagt plötzlich ein bewährtes Antibiotikum bei der Behandlung einer bakteriellen Infektion, so heißt die Erklärung dafür meist: Resistenz. Es kann mehrere Gründe haben, wenn ein ganzer Bakterienstamm gegen ein Medikament unempfindlich geworden ist.

a) Mutation im Erbgut der Bakterien und Selektion

Eine Bakterienpopulation besteht aus Milliarden einzelner Mikroorganismen. Darunter existieren immer Mutanten, deren Erbmasse verglichen mit den übrigen Vertretern der Population einen oder mehrere "Fehler" enthält. Derartige Abweichungen können durch Strahlung oder durch Chemikalien verursacht worden sein. Ein solcher Mutant trägt möglicherweise die Eigenschaft in sich, gegen Antibiotika unempfindlich zu sein, wohingegen "normale", d. h. nicht mutierte Keime, vernichtet werden. Sind diese Mutanten vermehrungsfähig, so vererben sie ihre Widerstandsfähigkeit weiter und werden zu Gründern eines neuen resistenten Stammes.

b) Umstellung im Stoffwechsel der Bakterien

Stellen Bakterien ihren Stoffwechsel in einer Anpassungsreaktion um, so bieten sie dem früher gegen sie wirksamen Antibiotikum unter Umständen keine Angriffspunkte mehr.

c) Bakterien entwickeln Abwehrstoffe

Manche Mikroorganismen, z. B. Streptococcen- und Sta-

phylococcenstämme, entwickeln unter dem Einfluß von Antibiotika Enzyme, die sogenannten β -Lactamasen, die das β -Lactamantibiotikum an verschiedenen Stellen angreifen und zerstören können.

Die Weitergabe eines solchen Erbgutes kann nun auf die verschiedensten Arten vonstatten gehen. Manche Einzeller vermehren sich nicht durch einfache Teilung, sondern durch geschlechtliche Vereinigung, der sogenannten Konjugation. Dabei dringt Chromosomenmaterial eines Einzellers in das Zytoplasma des anderen ein. Das kann Gestalt und Eigenschaften des Empfängers ändern und eventuell Antibiotikumresistenz übertragen. Weitere Möglichkeiten stellen die Transduktion und die Konversion dar. Bei der Transduktion dringt ein Phage, ein parasitäres Virus des Bakteriums, in einen Wirtorganismus ein, löst ein Chromosomenstück ab und transportiert es in ein anderes Bakterium. Bei der Konversion wird der Phage selbst ein Teil des Empfängerchromosoms.

Die infektiöse Resistenz wird durch den sogenannten R-Faktor verursacht. R-Faktoren sind ringförmige DNA-Stücke, auch Plasmide genannt, außerhalb der Chromosomen, auf denen bis zu 8 verschiedene Resistenzen kodiert sein können. Die Plasmide vermehren sich unabhängig vom Teilungszyklus der Zelle und werden über einen Plasmaschlauch auf ein anderes Bakterium übertragen, tückischerweise nicht nur innerhalb einer Bakterienart, sondern auch auf fremde Bakterien. Nach der "Infizierung" des Empfängers trennen sich die Keime wieder ¹⁾.

Es ist bisher noch nicht gelungen, dieser Resistenz-Entwicklung Einhalt zu gebieten. Es besteht nur die Chance, den Zeitraum zu nutzen, bis die Resistenz gegen ein Antibiotikum übertragen ist.

1.4. Bedeutung der Antibiotika

Es scheint heute unverständlich, daß Fleming sich nicht weiter mit dem Penicillin befaßte. Er verwendete es lediglich als lokales Antiseptikum.

Erst 1939, gut 10 Jahre nach seiner Entdeckung, begannen der australische Chemiker Howard W. Florey und der emigrierte deutsche Biochemiker Ernst Boris Chain in Oxford, sich mit der Reinigung und Stabilisierung des sehr empfindlichen Penicillins zu befassen. 1941 konnte bereits der erste Patient mit dem neuen Medikament behandelt werden. 1945 wurden die beiden Wissenschaftler mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Anfänglich war das kostbare Penicillin nur in geringen Ausbeuten erhältlich. Von der pharmazeutischen Industrie ging ein Mammut-Suchprogramm nach bisher unbekannten, produktiven Schimmelpilzstämmen aus. in einer verfaulten Melone schließlich wurde der Stamm *Penicillium chrysogenum* gefunden, der das Tausendfache des Fleming-Pilzes lieferte - 1000 Einheiten Penicillin pro Kubikmeter Kulturlösung.

Heute, etwa 40 Jahre nach der Einführung der β -Lactamantibiotika und Sulfonamide als Medikamente, kann sich kaum noch

jemand vorstellen, daß vor nicht allzu langer Zeit die Heilkunst schweren bakteriellen Infektionen hilflos gegenüberstand. Durch Anwendung der Sulfonamide und anderer Antibiotika ist z. B. die Sterblichkeit bei Gehirnhautentzündung (Meningitis) von 1930 bis 1976 auf ein Zehntel zurückgegangen^{1) 2)}.

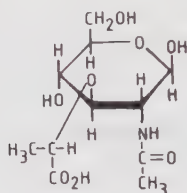
Die große Bedeutung der Penicillin- und Cephalosporinderivate läßt sich daran ermessen, daß jede zehnte Mark in der pharmazeutischen Industrie durch β -Lactamantibiotika verdient wird.

2. Wirkungsmechanismus der β -Lactamantibiotika

2.1. Aufbau der Bakterienzellwände

Wie bereits erwähnt, spielt die Zellwand eines Bakteriums die Hauptrolle beim Angriff eines β -Lactamantibiotikums und bei der anschließenden Vernichtung der Zelle. Das Bakterium ist vollständig von einer Zellwand eingehüllt, die ihm seine Gestalt und sein Aussehen verleiht und es vor schädigenden Einflüssen, wie z. B. dem osmotischen Druck, zu schützen vermag^{2) 6)}. Die Cytoplasmamembran (innere Zellwand) ist sowohl bei grampositiven als auch gramnegativen Bakterien mit einer Mureinschicht, auch Peptidoglycan- oder Mucopeptidschicht genannt, überzogen. Die Hauptstränge des Mureins bestehen aus

zwei alternierenden Aminosukcern, dem N-Acetylglucosamin (NAG) und der N-Acetylmuraminsäure (NAM). Die NAM-Einheiten sind mit Pentapeptidketten verknüpft, welche sowohl D- als auch L-Aminosäuren enthalten. Diese Peptidketten sind ihrerseits untereinander vernetzt. Die Art der Vernetzung ist von Bakterium zu Bakterium verschieden. Beim *Staphylococcus aureus* beispielsweise wird eine Pentaglycinkette an der freien ϵ -Aminogruppe des Lysins aufgebaut (Bild 1).



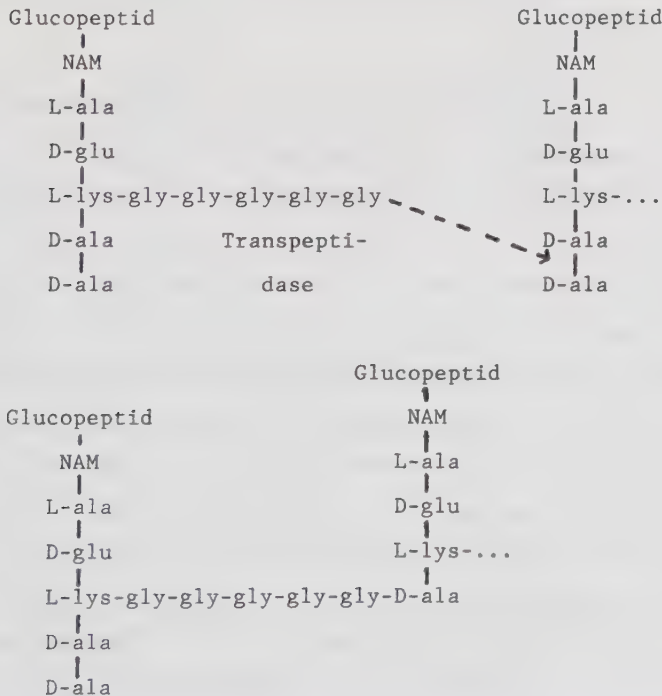
NAM

Bei der Quervernetzung schiebt sich die Aminogruppe eines endständigen Glycinrestes zwischen zwei D-Alanin-Einheiten einer benachbarten Peptidkette (Bild 1), spaltet in einer Transamidierungsreaktion das endständige D-Alanin ab und verbindet sich selbst mit dem anderen D-Alanin-Rest. Dieser Einschub gelingt nur mit Hilfe eines Enzyms, der Transpeptidase.

Gramnegative Mikroorganismen wie z. B. *Escherichia coli*, sind in Besitz einer sogenannten Carboxypeptidase, die eine D-Alanin-einheit abzuspalten vermag und auf diese Weise die

Größe des Oligomers limitiert. Die Komplexbildung dieser Carboxypeptidase durch Penicillin ist reversibel und durch Zugabe von β -Lactamasen aufzuheben. Ein solches Enzym wurde im grampositiven *Staphylococcus aureus* nicht gefunden.

Bild 1:



Die dreidimensionale Netzstruktur verleiht nun der Zellwand ihre Festigkeit. Im Unterschied zu den grampositiven, besit-

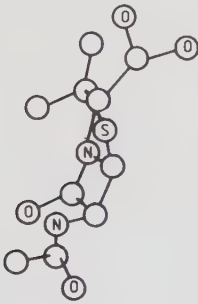
zen die gramnegativen Bakterien eine dünnere, weniger vernetzte Mureinschicht, aber zusätzlich eine äußere, auf ihrer Innenseite hydrophobe Membran. Sie enthält Phospholipide, Liposaccharide und Proteine ⁶⁾.

2.2. Angriff der β -Lactamantibiotika nach der Theorie von Strominger

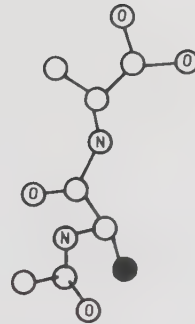
Wie hängt nun der Mechanismus der Zellwandsynthese mit der Molekularstruktur des Antibiotikums zusammen? Im Jahre 1965 formulierten Tipper und Strominger ⁷⁾ die Vermutung, daß Penicillin dieselbe Konformation besitzt, die auch vom D-Alanyl-D-alanin eingenommen werden kann. Bild 2 zeigt die Zeichnung von 6-Acylaminopenicillin und Acyl-D-alanyl-D-alanin, die nach Molekülmodellen angefertigt wurde. Die Peptidkette ist darin so dargestellt, daß sie dem Penicillin am ähnlichsten ist. Die Annahme, daß beide an derselben "active site" des Enzyms angreifen, ist bei Betrachtung des Bildes 2 nicht von der Hand zu weisen. Die Transpeptidase erkennt vermutlich das Penicillinmolekül als ihr Substrat und wird durch das Antibiotikum acyliert. Dabei wird die β -Lactambindung, analog der Peptidbindung im D-Alanyl-D-alanin, gespalten. Währenddem jedoch das Enzym bei der nämlichen Zellwandreaktion Tausende von Transpeptidierungsaktionen durchführt, d. h. immer wieder frei wird, wird es durch Penicillin irreversibel acyliert und steht nicht mehr für weitere Vernetzungsreaktio-

nen zur Verfügung. Die Festigkeit der wachsenden Bakterienzellwand geht verloren.

Bild 2:



Penicillin



Acyl-D-alanyl-D-alanin

Auf Grund dieser klaren Modellvorstellungen muß ein wirksames Antibiotikummolekül folgende Eigenschaften aufweisen:

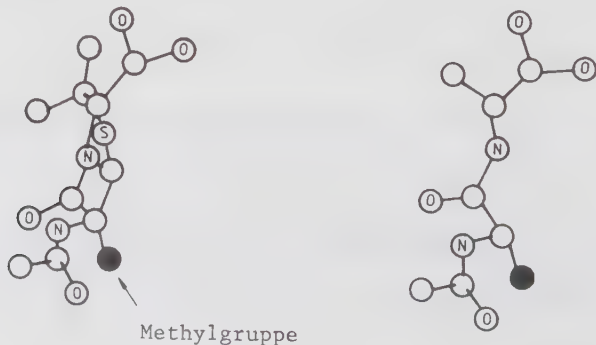
1. Es muß von seiner Struktur her für die Transpeptidase als "normales" Substrat erkennbar sein.
2. Es muß eine leicht spaltbare Bindung aufweisen, ähnlich der D-Alanyl-D-alanin-Peptidbindung.
3. Die Reaktion mit der Transpeptidase soll irreversibel sein.

Das in Punkt 3 genannte Enzym bewirkt eine Hydrolyse der Amidbindung, wobei es selbst acyliert wird. Während einer normalen Transpeptidierung entfernt eine freie Aminogruppe unter Schließung einer neuen Peptidbindung das Acylierungsagens wieder vom Enzym.

Bei der Acylierung durch ein β -Lactam wird verhindert, daß die Acylgruppe durch ein freies Amin wieder entfernt wird. Alle die oben beschriebenen Eigenschaften besitzt bereits das "klassische" Penicillin. Nach den Aussagen Stromingers aber sollte eine Methylgruppe in der 6 β -Position des Penicillingerüsts eine noch höhere antibakterielle Aktivität bewirken. Durch diese Methylgruppe wird nämlich die Antibiotikumstruktur der des D-Alanyl-D-alanins noch mehr angeglichen.

Bild 2 vergleicht das Penicillin ohne Methylgruppe mit dem Acyl-D-alanyl-D-alanin. In Bild 3 steht ein β -methyliertes Penicillingerüst dem Acyl-D-alanyl-D-alanin gegenüber. Vergleicht man nun diese beiden Abbildungen, so läßt sich sofort erkennen, daß die Einführung der Methylgruppe (Bild 3) die Ähnlichkeit des Antibiotikums zum "normalen" Substrat deutlich steigern konnte.

Bild 3:



2.3. Auswirkungen auf die Morphologie der Bakterienzelle

Nach einem erfolgreichen Angriff des β -Lactamantibiotikums kommt die räumliche Vernetzung in der Mureinschicht nicht mehr zustande. Welche sichtbaren Auswirkungen auf die Bakterienzelle hat dies zur Folge? Am besten sind wohl hervorgerufene Mißbildungen zu beobachten. Bei vielen Spezies forciert Penicillin die Ausbildung von osmotisch äußerst labilen Sphäroplasten. In einem anderen Fall entstehen fadenförmige Zellen, die sich dann zu Aggregaten zusammenlagern und die Teilung einstellen (bis zu 50 mal länger als normale Zellen). Im Cytoplasma existieren mehrere penicillinbindende Proteine, die sogenannten PBP's. Die verschiedenen β -Lactamantibiotika besitzen ganz unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen PBP's. Brian G. Spratt von der Universität Sussex fand heraus, daß jedem PBP eine bestimmte Funktion zukommt²⁾. So hat z. B. das PBP B1 mit der Zellstreckung, das PBP 2 mit der Zellform ganz allgemein und das PBP P3 mit der Zellteilung zu tun. Wird nun eines dieser drei Proteine in seiner Funktion beeinträchtigt, so hat das für die Zelle offenbar tödliche Folgen. Wohingegen eine Schädigung anderer PBP's keine irreparable Wirkung zeigt. Säugetierzellen werden von Penicillin und artverwandten Stoffen überhaupt nicht angegriffen und geschädigt, da in ihnen kein Murein gebildet wird. Daher ist die Wirkung auf die Bakterienzelle so spezifisch und der menschliche Organismus nimmt dabei kaum Schaden. Die bereits in der Einleitung erwähnte, von Paul Ehrlich Anfang dieses Jahrhunderts aufgestellte Forderung findet in den β -Lactamantibiotika ihre Erfüllung.

3. Stabilität und biologische Aktivität unterschiedlicher β-Lactamantibiotika

3.1. Einfluß der "Stickstoffpyramide" im β-Lactamgerüst

Wie bereits unter 2.2. beschrieben, muß die Struktur des β-Lactamantibiotikums für die Transpeptidase erkennbar sein, zum anderen muß sich seine Amidbindung leicht spalten lassen. Bei seiner Wirkung als reaktives Acylierungsmittel muß seine Lactambindung leichter zu öffnen sein als eine normale Peptidbindung ⁸⁾.

Für monocyclische β-Lactame läßt sich folgende Amidresonanz formulieren:



Diese entspricht der normalen Amidresonanz, wobei die C-N-Bindung verkürzt und die C-O-Bindung länger wird. Hierzu müssen allerdings die drei mit dem Stickstoff verknüpften Atome in einer Ebene liegen, damit das freie Elektronenpaar des Stickstoffes in die π-Bindung zum Carbonylkohlenstoff miteinbezogen werden kann. Im Penicillingerüst kann der Stickstoff nicht planar gebunden sein. Dies schwächt die Amidresonanz, verlängert die C-N-Bindung und verkürzt gleichzeitig die

C-O-Bindung und das äußert sich wiederum auch durch eine Erhöhung der IR-Carbonylfrequenzen.



Zusammenfassend läßt sich sagen:

Das nichtplanare Bindungssystem des bicyclischen β -Lactam-Stickstoffatoms schwächt die Amidresonanz stark ab. Das β -Lactam verliert an Stabilität, läßt sich leichter öffnen und besitzt somit möglicherweise eine größere biologische Aktivität.

3.2. Einfluß der Enaminresonanz

In gewissen bicyclischen β -Lactamantibiotika tritt zusätzlich noch eine Enaminresonanz auf.

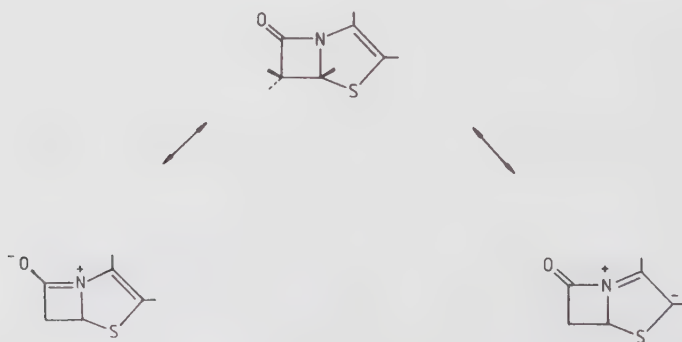
Sie läßt sich für ein Penemsystem wie folgt beschreiben:



Wie kann man die Enaminresonanz nachweisen? Die Röntgenstrukturanalyse von Cephalosporinen zeigt den verlängerten, zwischen Doppel- und Einfachbindung liegenden C(2) - C(3)- Bindungsabstand und die verkürzte C(3) - N(4)-Bindung.

Diese Untersuchungen am Cephalosporingerüst wurden vor allem von Morin und Mitarbeitern ⁹⁾ durchgeführt.

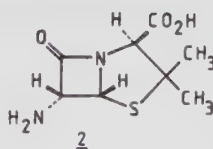
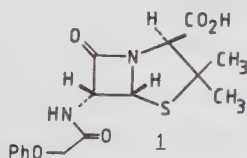
Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs ist in eine π -Bindung miteinbezogen, obgleich das Orbital, in dem es enthalten ist, s-Charakter besitzen muß, da ja der Stickstoff pyramidal gebunden ist. Diese Enaminresonanz und der pyramidale Stickstoff lassen die Amidresonanz im β -Lactam stark abnehmen. Es liegt also sehr nahe, daß eine β -Lactambindung, der ein α,β -ungesättigter Ring angegliedert ist, leichter spaltbar und möglicherweise auch antibakteriell wirksamer ist. Dieser Effekt ist noch ausgeprägter, wenn sich ein elektronenziehender Substituent in der C(2)-Position befindet.



3.3. Einfluß der Seitenketten

3.3.1. Stabilität gegenüber der Metabolisierung im Körper

Seitenketten und deren räumliche Anordnung besitzen eine zentrale Bedeutung für die antibakterielle Wirkung, die Verträglichkeit und die parenterale bzw. orale Anwendbarkeit des Antibiotikums. So bedeutete z. B. die Entdeckung des Phenoxypenicillins (Penicillin V) (1) im Jahre 1954 einen großen Fortschritt. Anders als Benzylpenicillin, welches von der Magensäure zersetzt wird, war 1 oral wirksam.



Tausende von Derivaten der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) (2) entstanden durch Acylierungsreaktionen. Dabei waren polare Acylreste mit Hydroxy-, Carboxy-, Sulfo- und Ureidogruppen am erfolgreichsten als Chemotherapeutika.

3.3.2. Einführung von 6ß-Substituenten

Der bei vielen gramnegativen Mikroorganismen beobachteten

Penicillinresistenz versuchte man zu begegnen, indem man in der 6 β -Position Substituenten, wie z. B. eine Methyl- oder Methoxygruppe, einführte. Ein äußerst wirksames Präparat besitzt in der oben genannten Stellung eine Formylaminogruppe ¹⁰⁾. Bis zu diesen 6 β -Substitutionsversuchen waren lediglich Veränderungen der Substituenten an der 6 α -ständigen Aminofunktion der 6-APS durchgeführt worden. Durch Kinetikmessungen der Zersetzung im gepufferten Medium unter physiologischen Bedingungen konnte bewiesen werden, daß in 6 β -Stellung methylierte Penicilline eine wesentlich höhere Stabilität besitzen.

3.3.3. Serumbindung der β -Lactamantibiotika

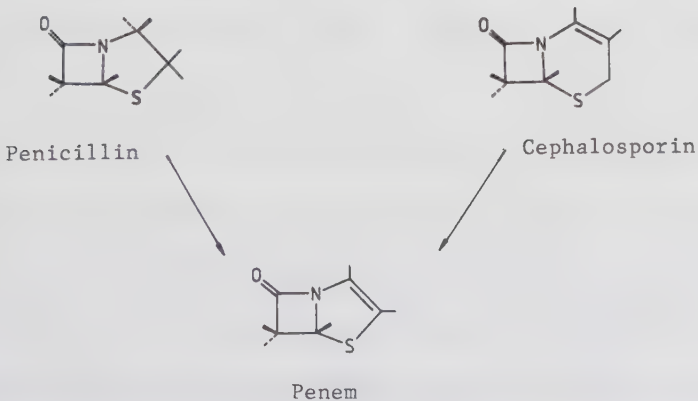
Eine reversible Bindung an Serumproteine tritt, bis zu einem gewissen Maß, bei allen Penicillinen und Cephalosporinen auf und verringert auf diese Weise die in vitro beobachtete antibakterielle Aktivität. Andererseits kann der Antibiotikum-Serumprotein-Komplex aber auch eine Depotfunktion übernehmen und auf diese Art eine rasche Metabolisierung und Ausscheidung des Wirkstoffes verhindern. Im allgemeinen werden Penicilline mit sperrigen, unpolaren 6-Acylaminogruppen stärker an Serumproteine gebunden als solche mit polaren Acylgruppen.

4. Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbeziehung nach den Theorien von Strominger

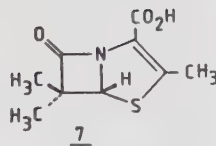
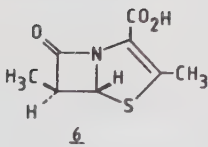
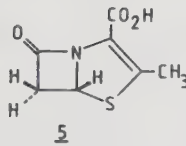
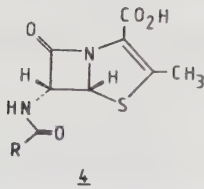
4.1. Untersuchungen am Penemsystem

4.1.1. Beziehung zwischen chemischer Stabilität und bakteriologischer Aktivität bei Penemen

Im Woodward Research Institute in Basel wurde 1975 von einer Arbeitsgruppe ein bis dahin unbekanntes β -Lactamgerüst gefunden (3) ¹¹⁾. Dieses sogenannte Penem stellt einen Hybrid aus Penicillin- und Cephalosporingerüst dar, wobei die Doppelbindung des Cephalosporins in den Thiazolidin-Fünfring des Penicillins aufgenommen wird.



Der Einfluß der 6-Substituenten der β -Lactamantibiotika ist vielseitig. Während bei Penicillin- und Cephalosporinderivaten ein Acylaminosubstituent in der 6 α -Stellung für die antibakterielle Wirksamkeit unerläßlich zu sein scheint, weisen in der Klasse der Peneme 6-Acylaminoverbindungen ¹¹⁾, wie z. B. 4, das in dieser Arbeit als Vergleichssubstanz diente, nur geringe antibiotische Wirkung auf, was auf der außerordentlich geringen Stabilität derartig substituierter Substanzen beruht. Überraschenderweise zeigte das 6-unsubstituierte Penem 5 ¹²⁾ im Gegensatz zu seinen Penicillin- und Cephalosporinanaloga ein breites antibiotisches Wirkungsspektrum. Die 6-monoalkylierten Peneme, z. B. 6, die noch etwas stabiler sind als die unsubstituierten, besitzen dieselbe umfassende Wirksamkeit. Ein Optimum bieten 6 β -Hydroxyethylsubstituenten ¹³⁾. Dagegen erwiesen sich die 6,6-dialkylsubstituierten Derivate, wie 7, mit ihrer sterisch stark abgeschirmten β -Lactambindung als extrem stabil, aber auch als biologisch völlig inaktiv. Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß, um ein gut wirksames Penemantibiotikum zu erhalten, ein Kompromiß geschlossen werden muß: Einerseits soll die β -Lactambindung möglichst reaktiv sein, um die bakterielle Zellwandsynthese zu hemmen. Andererseits soll sie aber nicht vom im Testmedium immer vorhandenen Wasser nukleophil geöffnet und vorzeitig deaktiviert werden. Zu diesen Wirksamkeitsbetrachtungen kommen nun noch Effekte, die im Säugetierorganismus auftreten, wie z. B. die bereits unter 3.3.3. behandelte Serumproteinbindung der Antibiotika.



Dazu läßt sich nun Folgendes zusammenfassend sagen:

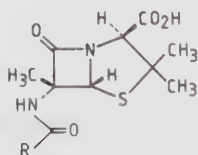
- a) Unsubstituierte Peneme (5) sind zwar chemisch stabil, weisen aber auf Grund ihrer geringen Polarität eine starke Serumbindung auf.
- b) 6 β -Acylaminosubstituierte Peneme (4) sind instabil, besitzen aber erwartungsgemäß auf Grund hoher Polarität der Seitenketten eine geringe Serumbindung.

Das ideale Penemantibiotikum müßte daher eine Acylaminoseitenkette aufweisen und chemisch stabil sein.

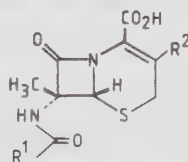
4.1.2. Auswahl des geeigneten Testsystems

Bereits Reiner und Zeller untersuchten 1968 ¹⁴⁾ am Penicillinsystem, ob die Einführung einer β -Methylgruppe in 6-Position eine Zunahme der antibiotischen Aktivität bewirkt, so wie es von Strominger und Tipper 1965 ¹⁵⁾ vorausgesagt worden war. Ihrer Theorie zufolge sollte durch diese Methylgruppe das Acyl-D-alanyl-D-alanin des Pentapeptids im Murein, das für die Zellwandsynthese essentiell ist, noch besser simuliert werden, so daß die Transpeptidaseaffinität zu diesem neuen Antibiotikum drastisch erhöht werden müßte. (siehe Bild 2 und 3).

Allerdings erwiesen sich die Penicilline und übrigens auch die Cephalosporine, die in der 6- bzw. 7-Position β -methyl- und α -acylamino substituiert waren, als derart chemisch stabil, daß die bakteriologische Aktivität gleichsam null war.



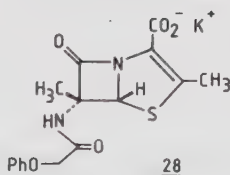
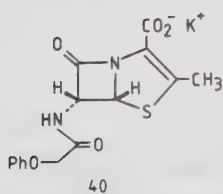
β -Methylpenicillin



β -Methylcephalosporin

Das Ziel dieser Arbeit war nun die Untersuchung der Strom-inger-Theorie an einem System, das von vorneherein eine geringere chemische Stabilität aufweist als die altbekannten β -Lactame. Hierzu bot sich nun die relativ neue Klasse der Peneme an.

Nach der Arbeitshypothese sollte ein β -methylsubstituier-tes System chemisch stabiler sein: Wegen seiner größeren strukturellen Ähnlichkeit mit dem Acyl-D-alanyl-D-alanin-Teil des Mureins wurde eine höhere antibiotische Aktivität für eine solche substituierte β -Lactamverbindung erwartet.



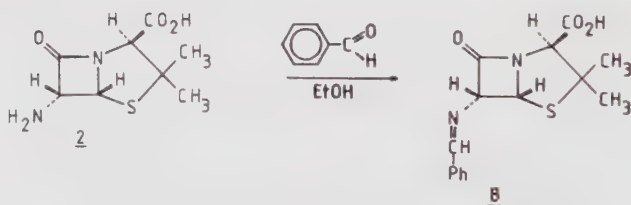
4.1.3. Optimierte Synthesen der Penemsysteme

4.1.3.1. Synthese der (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacet- amidopenem-3-carbonsäure (28)

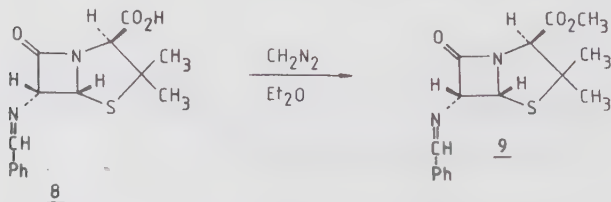
Als Testsysteme sollten die vom Penicillin V abgeleiteten

Peneme dienen. In beiden Synthesefolgen, sowohl bei der 6 β -methylierten Verbindung als auch der 6 β -unsubstituierten Vergleichssubstanz, wurde von der 6-Aminopenicillansäure (2) ausgegangen.

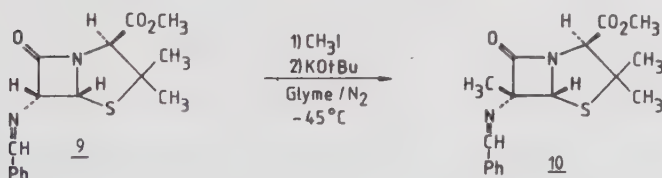
Um nun in der 6-Position eine Methylgruppe einführen zu können, war eine Aktivierung derselben vonnöten. Hierzu wurde die 6-Aminopenicillansäure mit Benzaldehyd umgesetzt. Die Kondensationsreaktion lieferte in guter Ausbeute die gelbe, kristalline 6-Benzylidenaminopenicillansäure (8).



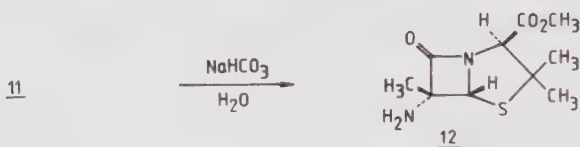
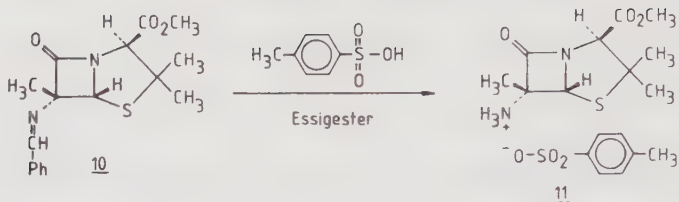
Da der 6-Benzylidenaminopenicillansäuremethylester (9) während der noch folgenden Syntheseschritte wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit besser zu handhaben war, wurde an dieser Stelle mit Diazomethan verestert. Die Umsetzung verlief quantitativ und lieferte einen feinkristallinen Ester.



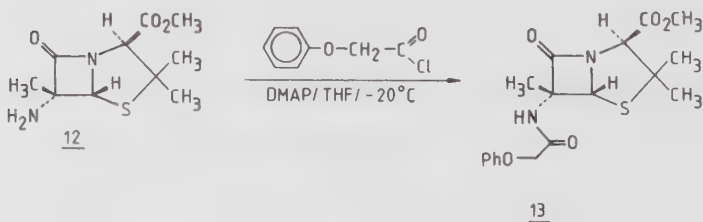
Durch die Einführung der Benzylidengruppe wurde die benachbarte C-H-Bindung der 6-Position genügend aktiviert, so daß durch Zugabe von Kaliumtertiärbutylat das Proton abstrahiert wurde. Die Methylsubstitution mittels Methyljodid als elektrophilem Agens erfolgte stereo- und regiospezifisch an der 6 β -Position. Im ^1H -NMR-Spektrum waren keine Diastereomerenpeaks aufzufinden. Die Reinigung durch Säulenchromatographie lieferte den reinen, kristallinen (6R)-6-Benzyliden-amino-6-methylpenicillansäuremethylester (10).



Die Struktur der Verbindung 10 konnte schon früher an Analogsubstanzen durch Röntgenstrukturanalyse belegt werden. Die Hydrolyse des Benzylimins 10 mit p-Toluolsulfonsäure ergab unter Beibehaltung der Konfiguration zunächst das entsprechende p-Toluolsulfonsäuresalz (11) und nach der Zugabe einer wäßrigen NaHCO_3 -Lösung den gewünschten (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12). Dieser wurde mit Methylenechlorid aus der wäßrigen Reaktionslösung entfernt.



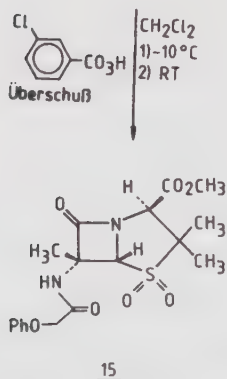
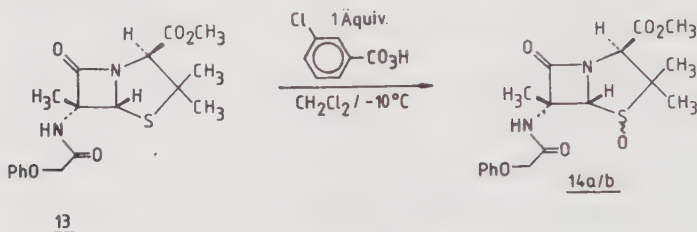
Der nächste Schritt war die Einführung der Penicillinseitenkette. Mit Phenoxyessigsäurechlorid verlief diese Acylierung der 6-Aminofunktion praktisch quantitativ. Die säulenchromatographische Reinigung ergab eine gute Ausbeute an farblosen Kristallen des (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylesters (13).



Bei der Oxidation von 13 mit einem Moläquivalent m-Chlorperbenzoesäure bei -10°C zum (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-oxid (14) traten Schwierigkeiten auf, da die Ergebnisse der Reaktion zunächst nicht eindeutig erklärt werden konnten. Wie aus der Dünnschichtchromatographie zu ersehen, waren zwei Produkte mit ähnlichem R_F -Wert entstanden, die sich aber durch Säulenchromatographie recht sauber trennen ließen. Diese beiden Substanzen lieferten sehr ähnliche ^1H -NMR-Spektren, mit demselben Aufspaltungsmuster, aber unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. Das legte nun die Vermutung nahe, daß die Oxidation zum Teil bis zum Sulfoxid fortgeschritten war. Um diesen Verdacht auszuräumen wurde gezielt bei Raumtemperatur, mit einem Überschuß an m-Chlorperbenzoesäure das (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-dioxid (15) herzustellen versucht. Auf diese Weise wurde nun eine Verbindung gewonnen, die einen größeren R_F -Wert aufwies als die beiden zuerst gefundenen Substanzen, aber wiederum ein ähnliches ^1H -NMR-Spektrum besaß. Offensichtlich handelte es sich bei den ersteren um das α - und β -Sulfoxid (14a und 14b), wohingegen bei der Überoxidation das Sulfoxid (15) entstanden war. Diese Schlußfolgerung wurde zusätzlich noch durch die passenden CH-Analysen untermauert.

Beide Sulfoxide waren isoliert worden und voneinander getrennt in die nun folgende Ringöffnungsreaktion eingesetzt worden. Hierbei lieferten sie dasselbe gewünschte Produkt (16). Nachdem dies sichergestellt war, wurden die beiden bei

der Oxidation entstandenen Sulfoxide 14a und 14b immer als Gemisch eingesetzt.



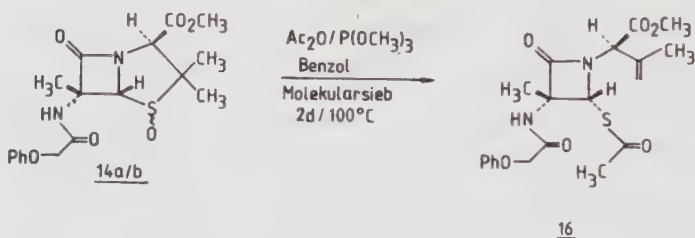
In die nun folgende thermische Abfangreaktion mit Essigsäureanhydrid und Trimethylphosphit zum (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (16) wurden nun die beiden Sulfoxide 14a und 14b ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Vorgehen nach der Literaturvorschrift ¹¹⁾ lieferte ein wenig zufriedenstellendes Ergebnis. Die Ausbeute an 16 war nur gering, dafür entstand aber eine Anzahl von Nebenprodukten. Die säulenchromatographische Trennung erwies sich

als sehr schwierig und aufwendig. Sie gelang obendrein nie vollständig. Da eine Trennung kaum möglich war, mußten die Reaktionsbedingungen variiert werden, so daß die Entstehung von Nebenprodukten weitgehend ausgeschlossen wurde.

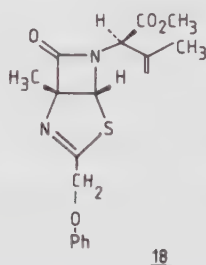
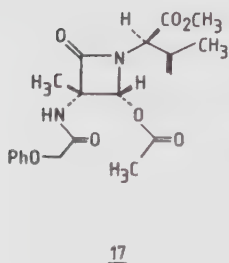
Dies macht folgende Überlegungen erforderlich.

Das Reaktionsgemisch wird bei einer Badtemperatur von 100 °C in absolutem Benzol gekocht. Aber Spuren von Wasser und Essigsäure, die während der Reaktion entstehen, begünstigen die Bildung von Nebenprodukten, wie dem (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetoxy-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (17) und dem (2R)-2-[(1R, 5R)-4,7-Diaza-5-methyl-6-oxo-3-phenoxy-methyl-2-thia-bicyclo[3.2.0]hept-3-enyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (18). Acetoxyverbindungen vom Typ 17, in unserem Fall unerwünschte Nebenprodukte, können aus Penicillinester-S-oxiden in einer thermischen Abfangreaktion mit Trimethylphosphit und wenig Essigsäure gezielt hergestellt werden. Also wurde der Versuch unternommen, das kondensierte Lösungsmittel durch einen mit Molekularsieb gefüllten Tropftrichter ins Reaktionsgefäß zurücklaufen zu lassen. Benzol mit einem Siedepunkt von 80.1 °C und Essigsäure mit einem Siedepunkt von 118.1 °C bilden ein Azeotrop, welches einen Siedepunkt von 80.1 °C aufweist und zu 98% Benzol und zu 2% Essigsäure enthält ¹⁶⁾. Wasser und Säure werden im Molekularsieb - eventuell wäre basisches Aluminiumoxid noch besser geeignet - zurückgehalten. Das gewünschte Umlagerungsprodukt 16 ließ sich nun in annehmbarer Ausbeute herstellen und kristallisierte gereinigt aus. Die Bil-

derung von 17 und 18 wurde nahezu unterbunden. Vor dem Einsatz des Molekularsiebes zur Entfernung von Wasser- und Säurespuren wurde eine durchschnittliche Ausbeute von 26% - 27% erzielt. Danach war eine Steigerung der Ausbeute um 100% auf 53% 16 möglich.

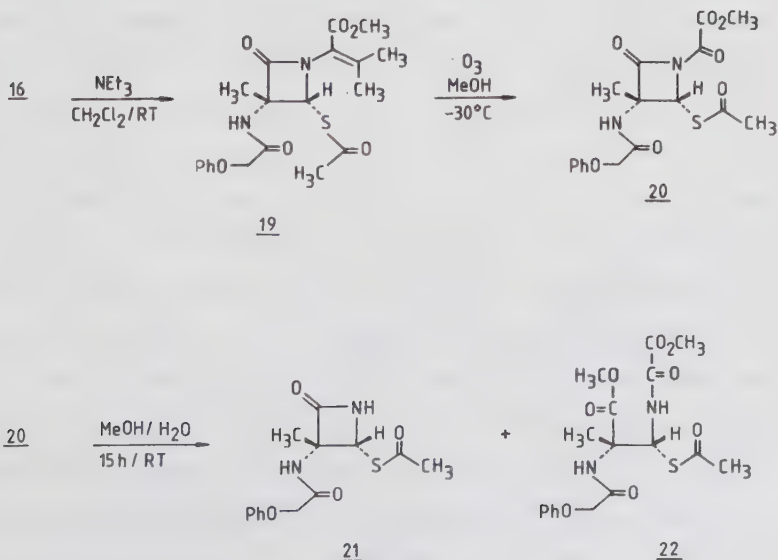


Die folgenden Nebenprodukte entstanden kaum noch:



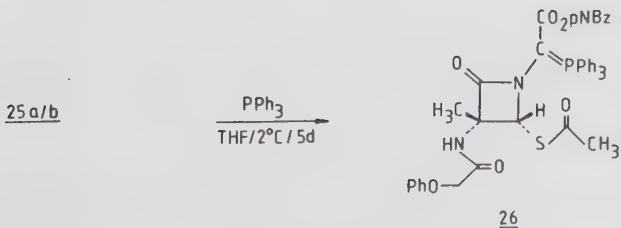
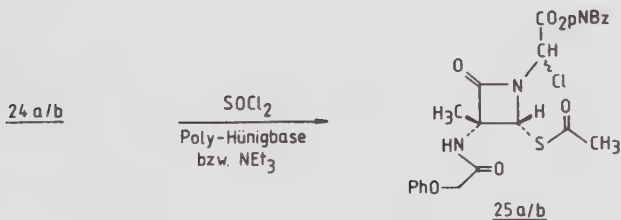
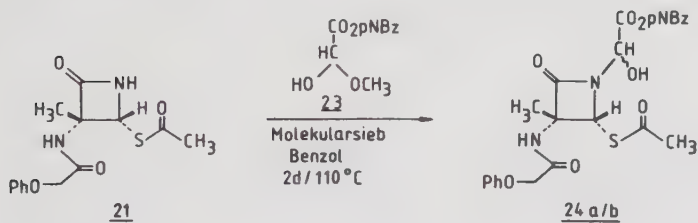
Die Verschiebung der Doppelbindung von 16 aus der 3- in die 2-Position gelang durch Zugabe von Triethylamin zu einer Methylenchloridlösung. In quantitativer Isomerisierungsre-

aktion entstand der 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethylester (19). Aus diesem ließ sich durch Ozonolyse bei -30 °C in Methanol ein Oxalsäurederivat, der 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (20) gewinnen. Dieser war auf Kieselgel nicht stabil, wurde jedoch sauber und in guter Ausbeute direkt aus der Ozonolyse erhalten, so daß er sofort ohne Reinigung zur Methanolyse eingesetzt werden konnte. Als Hauptprodukt entstand dabei das gewünschte (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on (21). Zu einem geringen Anteil wurde das offenkettige Produkt 22 gefunden, bei dem der β -Lactamring hydrolytisch gespalten worden war.

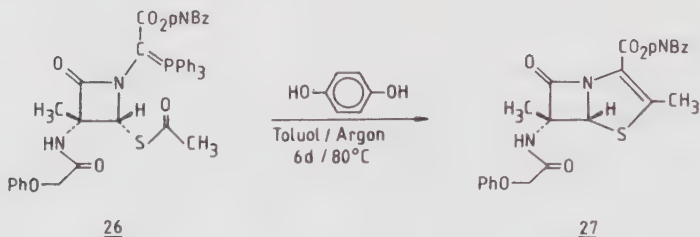


Die Addition von 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylester (23) an das Azetidinon 21 gelang nach der Literatur nur in geringen Ausbeuten ¹¹⁾. Nach dieser Vorschrift wurde 4 Stunden mit Molekularsieb in Toluol gerührt. Die Umsetzung konnte allerdings optimiert werden, als das Reaktionsgemisch, bestehend aus 21 und 23, zwei Tage lang in wenig Benzol rückflußgekocht wurde. Dabei tropfte das kondensierte Lösungsmittel, wie oben bereits beschrieben, über einen mit Molekularsieb gefüllten Tropftrichter in das Reaktionsgefäß zurück. Die chromatographische Reinigung lieferte 76% eines analysenreinen Diastereomerengemisches aus den (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylestern (24 a/b). Dieses Gemisch aus 24a und 24b wurde sofort weiter umgesetzt. Zum einen wurden die diastereomeren (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (25a und 25b) mit Thionylchlorid und Poly-Hünigbase, zum anderen mit Thionylchlorid und Triethylamin hergestellt. Beide Methoden erwiesen sich in der Ausbeute als nahezu gleichwertig. Daher wurde letztere gewählt, mit Triethylamin als kostengünstigerem Reagens. Die Chloride 25a und 25b sind auf Kieselgel nur begrenzt stabil, lassen sich aber bei kurzer Verweildauer auf Chromatographiesäule oder -platte reinigen. Dieser Reinigungsschritt ist aber für die folgende Darstellung des 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphoranylidenessigsäure-p-nitrobenzylesters (26) nicht nötig.

Während dieser Synthese ließ man eine Lösung von 25a und 25b sowie Triphenylphosphin in absolutem Tetrahydrofuran 5 Tage bei 2 °C stehen. Die basische Aufarbeitung und anschließende chromatographische Reinigung lieferte 26 in einer Ausbeute von 56% über die letzten drei Stufen.



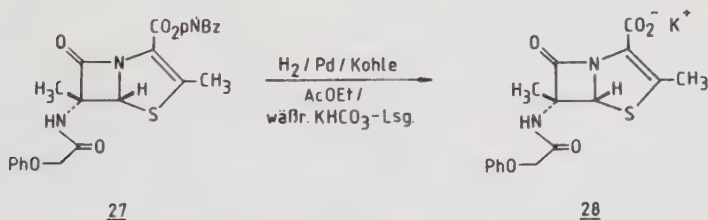
In einer intramolekularen Wittig-Reaktion vollzog sich der Ringschluß von 26 zum Penemgerüst des (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure-p-nitrobenzylesters (27). Dazu wurde das Phosphoran 26 in stark verdünnter Toluollösung mit einer Spur Hydrochinon unter Schutzgasatmosphäre, bei einer Badtemperatur von 80 °C 6 Tage lang gerührt, bis die Reaktion vollständig abgelaufen war. Zur Reinigung empfahl sich die Verwendung einer speziellen Tieftemperaturchromatographiesäule mit Kühlmantel. Auf diese Weise war ständig eine Temperatur von -30 °C gewährleistet, was sich außerordentlich günstig auf die Ausbeute auswirkte (72% einer analysenreinen Verbindung 27).



27 eignete sich hervorragend als Aufbewahrungsform für die relativ instabile freie Penemcarbonsäure, die sich je nach Bedarf, rasch durch katalytische Hydrierung aus dem Ester gewinnen ließ.

Diese Hydrierung wurde in einer speziellen Mikroapparatur mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator, in einem zweiphasigen Medium aus Essigester und wäßriger KHCO_3 -Lösung,

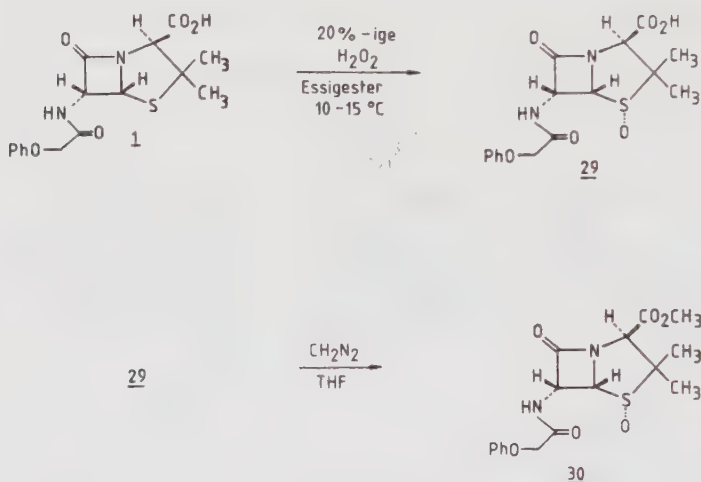
durchgeführt. Die während der Reaktion entstehende (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure (28) ging dabei als Kaliumsalz in die wäßrige Phase über, welche nach der Filtration des Katalysators abgetrennt wurde. Mit Hilfe eines UV-Spektrums ließ sich die Konzentration von 28 in der Lösung bestimmen. Eben diese Lösung diente zur Durchführung der mikrobiologischen Tests und der Kinetikmessung.



4.1.3.2. Synthese der (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure als Vergleichssubstanz (40)

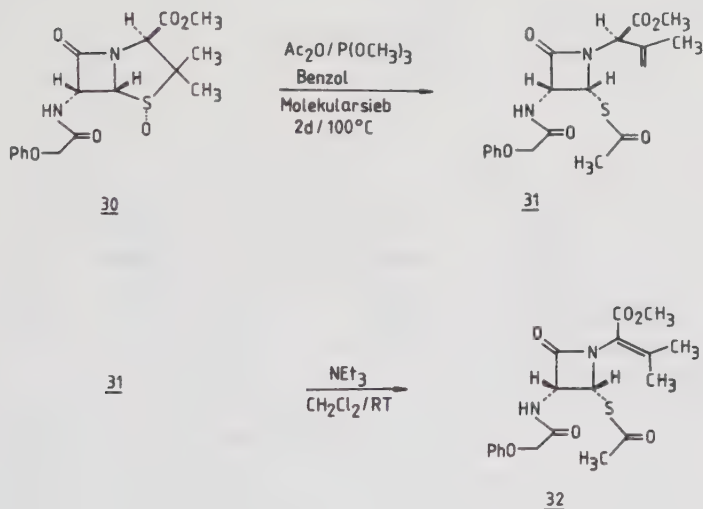
In dieser literaturbekannten Synthese der Vergleichsverbindung ¹¹⁾ bildete nun das Penicillin V (1) selbst die Ausgangsbasis für die Penemsynthese. Bei der Oxidation mit 20%-igem H_2O_2 in Eisessig bei 10 - 15 °C entstand selektiv, im Unterschied zur β -Methylverbindung, das 6-Phenoxyacetamidopenicillansäure- β -S-oxid (29) ¹⁷⁾. Sofort nach dem

Trocknen der Substanz erfolgte die Umsetzung mit etherischer Diazomethanlösung zum 6-Phenoxyacetamidopenicillansäuremethyl-ester- β -S-oxid (30).



Die thermische Abfangreaktion von 30 mit Essigsäureanhydrid und Triphenylphosphit in absolutem Benzol bei ca. 100 °C Ölbadtemperatur wurde ebenfalls nach der neuen, modifizierten Methode durchgeführt, wobei man das kondensierte Lösungsmittel zur Entfernung von Säurespuren über Molekularsieb leitete. Die Reaktionszeit verkürzte sich dabei etwas. Auch hier konnte eine Unterdrückung von Nebenreaktionen und eine Steigerung der Ausbeute an (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (31) gegenüber der in der in der Literatur beschriebenen

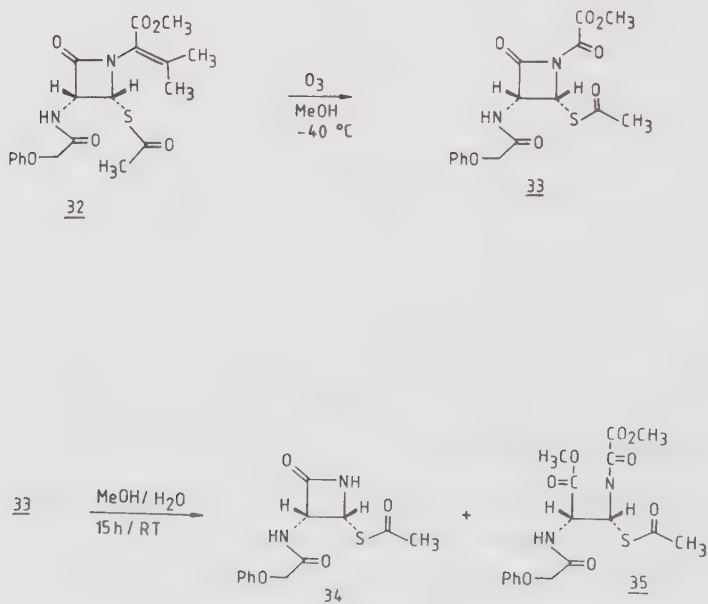
nen Methode eindeutig beobachtet werden. Die Ausbeute konnte, genau wie bei der β -Methylverbindung bereits beschrieben von 26% auf 58% verbessert werden.



Die Isomerisierung der Doppelbindung mit Triethylamin verlief wiederum quantitativ.

Bei der Ozonolyse zum 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (**33**) bei -40°C fiel bereits nach kurzer Einleitungsdauer ein weißer, kristalliner Niederschlag des Produktes aus. Nach der Filtration konnte zusätzliches **33** durch die reduktive Aufarbeitung des Filtrates isoliert werden. Diese Verbindung wurde lediglich getrocknet und ohne weitere Reinigung

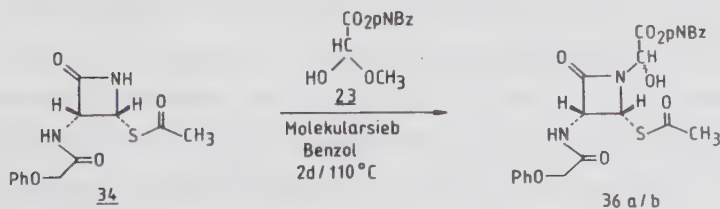
in die nun folgende Methanolysereaktion eingesetzt, in der außer dem Hauptprodukt, dem (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on (34) auch noch eine vernachlässigbar geringe Menge einer Verbindung mit einem hydrolytisch gespaltenen β -Lactamgerüst (35) entstand. Das Azetidinon 34 ließ sich durch Säulenchromatographie sehr gut reinigen.

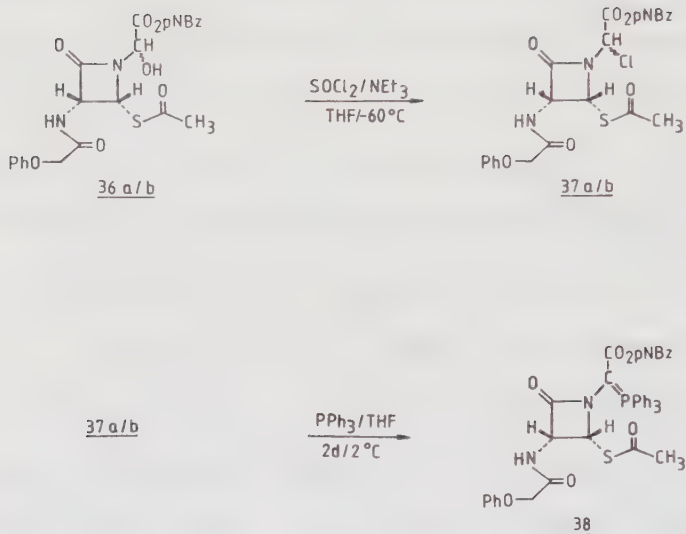


Die Addition des 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylesters (23) erfolgte durch Rückflußkochen in Benzol bei einer Badtemperatur von 120 °C, wobei das kondensierte Benzol über Molekularsieb in das Reaktionsgefäß zurückgeleitet und das entstehende Wasser und Methanol zurückgehalten wurde.

Die säulenchromatographische Reinigung lieferte ein Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (36a/b) in 87 %-iger Ausbeute.

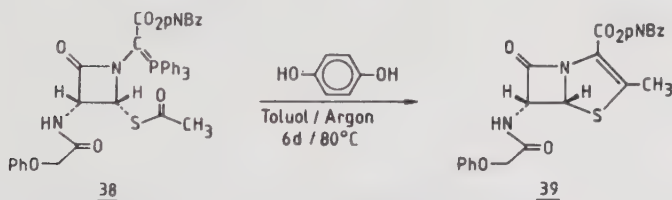
Die durch Umsetzung mit Thionylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran aus 36a/b entstandenen diastereomeren 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (37a/b) wurden umgehend, ohne Reinigung, zur Darstellung des 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphorylidenessigsäure-p-nitrobenzylesters (38) eingesetzt. Die Umsetzung dauerte 2 Tage bei 2°C. Die basische Aufarbeitung und anschließende chromatographische Reinigung lieferten 38 in 60% Ausbeute über die letzten drei Stufen.



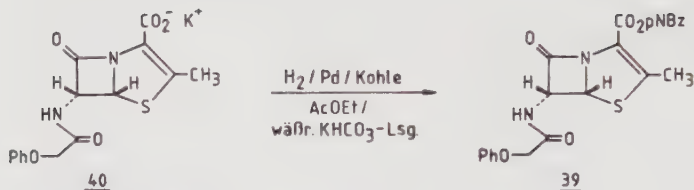


Der nun folgende Schritt der intramolekularen Wittigreaktion zum Penemgerüst des (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamido-penem-3-carbonsäureester (39) warf einige Probleme auf. Diese Wittig-Kondensation, die im früher untersuchten Fall den 6β-methylsubstituierten Penemester in guter Ausbeute lieferte, verlief nun weit weniger erfolgreich. Der 6β-unsubstituierte Penemester zersetzte sich nachweislich (im Dünnschichtchromatogramm) auch bei starker Verdünnung während der thermischen Reaktion. Deshalb mußte die Reaktion schon nach einer Halbwertszeit unterbrochen und das noch vorhandene Ausgangsmaterial neben dem Produkt und Triphenyl-

phosphin durch Säulenchromatographie aufgearbeitet werden. Diese Reinigung von 39 erfolgte bei -30°C mit der Spezialtiefemperatursäule.



Die hydrogenolytische Spaltung des p-Nitrobenzylesters 39 wurde in der Mikrohydrierapparatur mit Pd/Aktivkohle im zweiphasigen Essigester/wäßrigen KHCO₃-Lösungs-Gemisch durchgeführt. Die dabei entstandene freie (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure (40), welche als Kaliumsalz in die wäßrige Phase überging, erwies sich als derart instabil, daß sie sich bereits während der laufenden Hydrierung, trotz Kühlung, zersetzte. Im UV-Spektrum konnten jeweils nur geringe Konzentrationen dieser Substanz nachgewiesen werden, welche jedoch für die Stabilitätsmessungen und für die mikrobiologischen Tests ausreichten.



4.1.4. Ergebnisse der kinetischen Messungen

Die Messungen der Reaktivitäten der beiden zu vergleichenden Substanzen 28 und 40 unter physiologischen Bedingungen, d. h. bei einer konstanten Temperatur von ca. 37 °C und in einer Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 7.4, bewiesen die Richtigkeit der ersten Arbeitshypothese. Derzufolge sollte, wie bereits unter 4.1.2. beschrieben, die 6β-methylierte Verbindung 28 stabiler sein als das 6β-unsubstituierte Penem 40. Bereits bei der Ringschlußreaktion und der darauffolgenden hydrogenolytischen Esterspaltung zur freien Penemcarbonsäure 40 konnte auf Grund der geringen Ausbeuten, bei identischer Versuchsführung, auf eine weit geringere Stabilität der Substanz 40 geschlossen werden. Die UV-Messungen

ergaben nun für 40 eine mittlere Halbwertszeit von 59 Minuten. Eine mikrobiologische Wirkungsuntersuchung war daher gerade noch möglich und sinnvoll. Die kurze Lebensdauer von 40 machte ein rasches Vorgehen erforderlich.

Die 6 β -methylierte Penemcarbonsäure 28 erwies sich, wie erwartet, als wesentlich stabiler mit ihrer mittleren Halbwertszeit von 7 Stunden und 32 Minuten.

4.1.5. Ergebnisse der bakteriologischen Tests

Für die Aktivitätsbetrachtungen und -vergleiche dienten als nicht-resistenter Bakterienstamm der *Staphylococcus aureus* DSM 1104, als β -lactamaseproduzierende Spezies die Stämme *Staphylococcus aureus* 23824, *Staphylococcus aureus* 12484/77 und *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Als Maß für die bakteriologische Aktivität wurden die Durchmesser der Hemmhöfe in mm verwendet.

Die freien Penemcarbonsäuren 28 und 40 wurden für jeden Test frisch aus den entsprechenden p-Nitrobenzylestern durch hydrogenolytische Esterspaltung hergestellt.

Um die antibakterielle Aktivität nicht nur gegeneinander abzuwägen, sondern auch in Relation zu bekannten β -Lactamantibiotika setzen zu können, wurden Penicillin V (1), Penicillin G (43) und Cephalosporin als Vergleichssubstanzen aufgetragen.

Ihre Wirksamkeit gegenüber dem nicht-resistenten Staphylo-

coccus aureus-Stamm DSM 1104 ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1:

Staphylococcus aureus DSM 1104
Hemmhofdurchmesser (mm)

Penicillin V	37
Cephalosporin	32
<u>28</u> (methybsubst.)	25
<u>40</u> (unsubst.)	16

Die Wirksamkeit verschiedener β -Lactamantibiotika im Vergleich zu 28 und 40 gegenüber resistenten, d. h. β -lactamaseproduzierenden Staphylococcenstämmen ist in Tabelle 2 aufgeführt. Gegen Escherichia coli, auch gegen nicht-resistente, und Pseudomonas aeruginosa erwiesen sich die beiden Peneme 28 und 40 als unwirksam.

Auf Foto 1 und 2 sind die unterschiedlichen Aktivitäten der

einzelnen β -Lactamantibiotika gegen resistente und nicht-resistente Staphylococcen deutlich zu erkennen.

Tabelle 2:

Staphylococcus aureus res.			
Hemmhofdurchmesser (mm)			
	13824	12484/77	ATCC 29213
Penicillin V	10	Ø	36
Penicillin G	Ø	10	20 - 27
Cephalosporin	32	Ø	20
<u>28</u> (methybsubst.)	23	24	15
<u>40</u> (unsubst.)	14	Ø	9

Ø = keine Hemmung

Als direkter Aktivitätsvergleich wurden verdünnte Lösungen von 28 gegen eine 0.1 %-ige Lösung von 40 auf einer mit Staphylococcus aureus beimpften Platte aufgetragen. Die Ergebnisse sind auf Foto 3 sehr gut zu erkennen. Die Hemmhof-

durchmesser für die verschiedenen Konzentrationen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3:

Konzentration von <u>28</u> (methylnsubst.)	Staphylococcus aureus DSM 1104	Konzentration von <u>40</u> (unsubst.)	Staphylococcus aureus DSM 1104
0.1 %	24		
0.05 %	21		
0.025 %	20		
0.012 %	17	0.1 %	17
0.006 %	10		

Auch hier wurden die Hemmhofdurchmesser (mm) angegeben.

Diese Vergleichsplatte, siehe auch Foto 3, gab nun zu erkennen, daß 28 dreimal um die Hälfte verdünnt werden mußte, um die Wirksamkeit von 40 zu erreichen, d. h. 28 ist ca. 8 mal antibakteriell aktiver als die freie Penemsäure 40.

Die Befunde entsprachen nun genau der Theorie von Strominger und Tipper ¹⁵⁾. Die 6 β -methylierte Penemsäure 28 erwies sich gegen alle getesteten Staphylococcenstämme als wesentlich aktiver als die 6 β -unsubstituierte. Die Wirksamkeit von 28 gegenüber resistenten und nicht-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen ist etwa identisch, wohingegen eine deutlich Aktivitätsabnahme von Penicillin V gegen resistente Bakterien zu beobachten ist (Vergleich: Foto 1 und 2).

Diese Feststellung wird auch weitgehend durch die Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werte) gestützt. Allein der Stamm Staphylococcus aureus ATCC 29213 fällt etwas aus dem Rahmen. Ein klarer, ungetrübter Hemmhof liefert ein weiteres Indiz für die antibakterielle Aktivität gegenüber β -lactamaseproduzierenden Stämmen.

4.1.6. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK)

Die Minimale Hemmkonzentration ist ein Maß für die antibakterielle Wirksamkeit eines Antibiotikums. Sie gibt an, wieviele μ g Antibiotikum vonnöten sind, um in einem Milliliter Bakterienlösung das Wachstum der Bakterien gerade noch zu unterbinden.

In Tabelle 4 sind die MHK-Werte der beiden zu untersuchenden Penemsysteme 28 und 40 einander gegenübergestellt.

Den MHK-Werten läßt sich entnehmen, daß die 6 β -methylierte Verbindung 28 gegen alle angegebenen Staphylococcenstämme gleich wirksam ist. Sehr deutlich zeigt sich daraus, daß die

6 β -unsubstituierte Vergleichsverbindung 40 eine wesentlich geringere antibakterielle Aktivität aufweist und zwar bei jedem der getesteten Stämme.

Tabelle 4:

Staphylococcus aureus				
	DSM 1104	ATCC 29213	23824	012484/77
<u>28</u>	12.5	12.5	25	6
(methylsubst.)				
<u>40</u>	50	100	Ø	25
(unsubst.)				

Angegeben wurden die μg β -Lactam in 1 ml Bakterienlösung
 Ø = keine Hemmung

Die hier gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß das in der 6-Stellung methylsubstituierte Penem ein besseres Substrat ist für das relevante Enzym bei der bakteriellen Zellwandsynthese, wie es die Strominger-Theorie vorher-sagte.

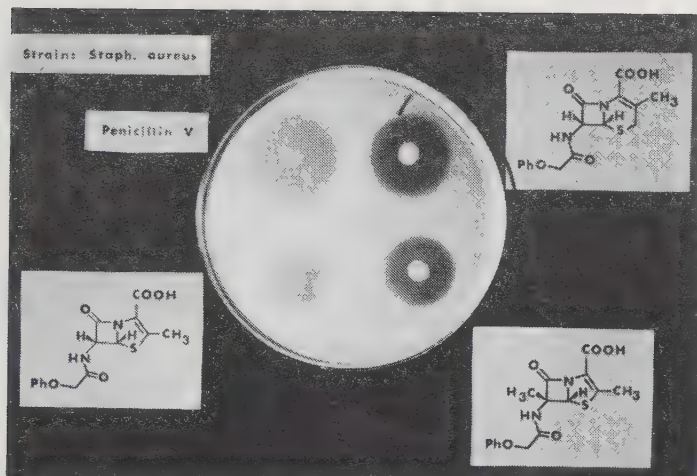


Foto 1

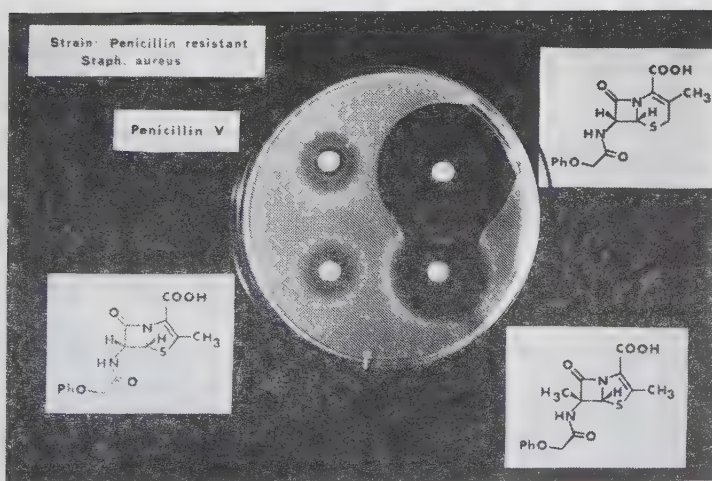


Foto 2

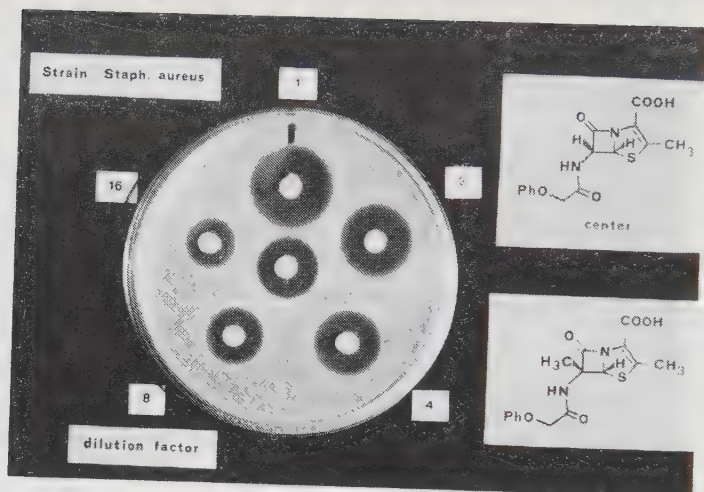


Foto 3

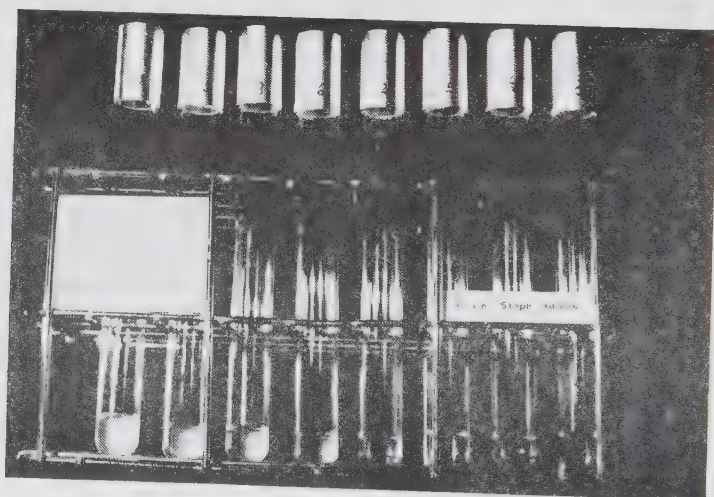
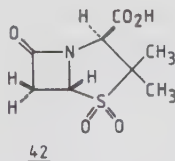
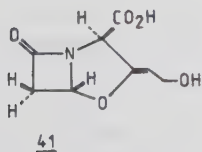


Foto 4

4.1.7. Test auf β -Lactamaseinhibitorfähigkeit von 28

Mit den β -Lactamaseinhibitoren versucht man die β -lactamaseproduzierenden Bakterien in den Griff zu bekommen. Bei der Bekämpfung der Bakterien teilen sich Penicillin und β -Lactamasehemmer die Arbeit. Während das Penicillin die Keime abtötet, blockiert der β -Lactamasehemmstoff die schädlichen Enzyme und hält sie von einem empfindlichen Partner (Penicillin) fern. Die Inhibitoren lagern sich quasi als Konkurrenz des Penicillins an die β -Lactamase an. Die Hemmwirkung der zuerst gefundenen Inhibitoren beruhte auf einem kompetitiven, reversiblen Mechanismus und große Inhibitor-konzentrationen waren nötig, um ein β -lactamaseempfindliches Antibiotikum zu schützen. Damit wurde die klinische Anwendbarkeit solcher Kombinationspräparate stark eingeschränkt. Nachdem man nun mit der Clavulansäure (41) und ähnlich wirkenden Verbindungen, wie z. B. dem Sulbactam (42), über Inhibitoren verfügt, die die β -Lactamasen nicht nur zeitweilig, sondern ein für allemal inaktivieren, ist die Möglichkeit des antibiotischen Doppelangriffs wieder attraktiv geworden.



Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Theorie von Strominger sollte auch die Wirksamkeit von 28 als β -Lactamaseinhibitor getestet werden. Dazu wurden jeweils auf einer Bakterienagarplatte mit verschiedenen resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen reines Penicillin G (43), reines 28 und ein Gemisch aus beiden aufgetragen. Eine positive Wirkung sollte sich an einer Vergrößerung des Hemmhofes der Kombination erkennen lassen. Eine Zusammenfassung der dabei gefundenen Ergebnisse findet sich in Tabelle 5.

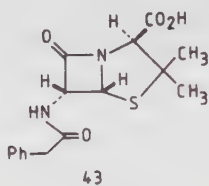


Tabelle 5:

	Staphylococcus aureus			Escherichia
	ATCC 29213	012484/77	23824	coli W 3110
Penicillin G	36	10	Ø	9
<u>28</u>	20	24	23	Ø
Penicillin G	39	32	26	12
+				
<u>28</u>				

Angegeben wurde der Hemmhofdurchmesser in mm.

Um aus Tabelle 5 Schlüsse ziehen zu können, war ein Vergleich mit einem bekannten Inhibitor erforderlich. Dieser sollte den beobachteten Effekt in der richtigen Relation zeigen. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der bakteriologischen Tests mit Sulbactam und Penicillin G als Kombinationsantibiotikum aufgeführt.

Tabelle 6:

Staphylococcus aureus 23824

Hemmhofdurchmesser (mm)

Penicillin G	Ø
Sulbactam	16
Penicillin G	
+	23
Sulbactam	

Ø = keine Hemmung

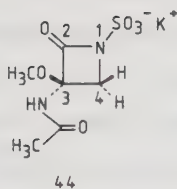
Auf Grund der ermittelten Ergebnisse läßt sich die Folgerung nicht von der Hand weisen, daß die Substanz 28 eine, wenn

auch geringe, Inhibitorwirkung zeigt, was besonders bei dem Stamm *Staphylococcus aureus* 012484/77 deutlich wird. Allerdings können die Aussagen nicht für absolut genommen werden, da das Penem 28 allein bereits antibakterielle Wirkung zeigt, welche diejenige des Sulbactams bei weitem übertrifft.

4.2. Monobactamsynthese aus (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12)

4.2.1. Die neue Klasse der Monobactame

1981 berichteten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen von der Entdeckung einer neuen Naturstoffklasse, den Monobactamen ^{18) 19)}. Ihr Merkmal ist ein 4-unsubstituierter β -Lactamring mit einer 3-Acylamidogruppe und einer in der Natur sehr selten auftretenden N-SO₃H-Funktion. Die natürlich vorkommenden Monobactame sind zumeist 3-methoxy-substituiert. Die Monobactame stellen nicht wie die Penicilline und Cephalosporine die Stoffwechselprodukte von Pilzen und Actinomyceten, sondern von Bakterien dar. Das einfachste in der Natur vorkommende Monobactam ist das vom Chromobakterium violaceum produzierte 44 ¹⁹⁾.



Die weitgehend penicillinasefeste Stoffklasse ist wirksam gegen gramnegative Erreger von Infektionen und Pseudomonaden, weniger gegen grampositive. Einige Monobactamderivate eignen sich vorzüglich als β -Lactamaseinhibitoren. Die planare Struktur des Monocyclus schließt eine Aktivierung der Amidbindung nach Art des Penicillins aus (Stickstoffpyramide). Das läßt nur den Schluß zu, daß wohl die Sulfonatgruppe für die Aktivierung der Amidbindung verantwortlich ist, was durch die Unwirksamkeit N-unsubstituierter Azetidinone bewiesen wird ²⁰⁾. Page fand, daß bei der basenkatalysierten β -Lactambindungshydrolyse des Penems der elektronenziehende Effekt des S-Atoms ebenso wichtig ist wie die Deformation der Amidbindung ²¹⁾. Daraus läßt sich nun folgern, daß außer der Sulfonat auch andere Gruppen mit negativer Ladung, die am β -Lactamstickstoff hängen, eine Aktivierung bewirken können.

Die Einführung der N-Sulfonsäuregruppe am unsubstituierten N-1 eines vorgefertigten β -Lactamringes erfolgt mittels verschiedener SO_3 -Komplexe ²²⁾, wie z. B. Pyridin SO_3 oder

DMF SO_3 .

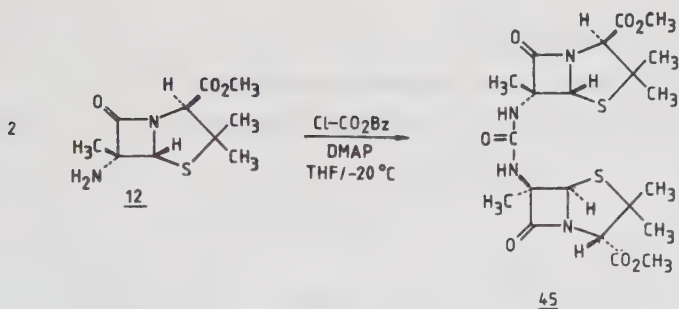
Die absolute Konfiguration der natürlich vorkommenden Monobactame (ohne Methoxyfunktion) ist mit derjenigen der Penicilline identisch. Sie reagieren beide an derselben "active site" eines Enzyms. Diese Beobachtungen legten nun nahe, die von Strominger erstellten Theorien auch an der Klasse der Monobactame zu untersuchen.

4.2.2. Synthese des (3R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methylazetidin-2-ons (52)

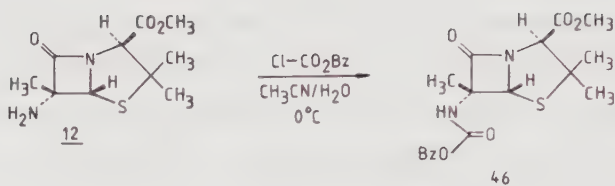
Obwohl sich eine Untersuchung der 3 β -methylsubstituierten Monobactame erübrigte, da eine solche bereits von T. Hirose und Mitarbeitern ²³⁾ durchgeführt worden war, soll dennoch der eingeschlagene Syntheseweg vorgestellt werden. Die Herstellung verläuft, ausgehend von β -methylierten 6-Aminopenicillansäuremethylester (12), stereospezifisch durch Abbau des Thiazolidinringes zum entsprechenden Azetidinon (52). Die japanische Arbeitsgruppe führte eine nicht-spezifische Totalsynthese durch, die eine anschließende Trennung unbedingt erforderlich machte, da nur das Enantiomere mit der richtigen, sprich in der Natur vorkommenden, absoluten Konfiguration bakteriologisch wirksam ist.

Im ersten Schritt unserer Synthese sollte nun die freie 3-Aminofunktion von 12 mit einer Benzoxycarbonylgruppe geschützt werden, die zum Schluß leicht wieder entfernt und durch an-

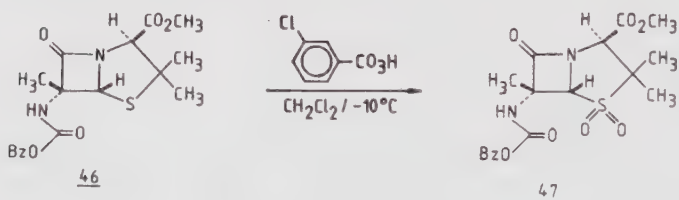
dere Seitenketten ersetzt werden kann. Nach der Umsetzung von 12 mit Chlorameisensäurebenzylester wurde zunächst ein Harnstoffderivat isoliert, was vermutlich auf eine Verunreinigung des Chlorameisensäurebenzylesters mit Phosgen, woraus dieser hergestellt wird, zurückzuführen war.



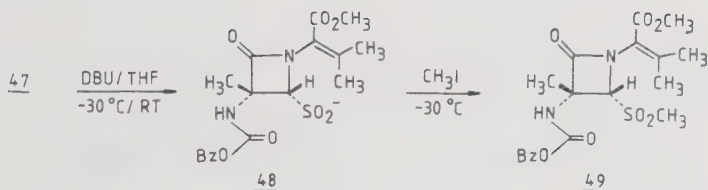
Nach Abwandlung der Reaktionsbedingungen und Verwendung von gereinigtem Chlorameisensäurebenzylester wurde der geschützte (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillansäuremethylester (46) erhalten. Die Umsetzung wurde nicht mehr, wie zuvor, in Tetrahydrofuran sondern in Acetonitril/Wasser durchgeführt und lieferte nach säulenchromatographischer Reinigung nahezu quantitativ 46 als farbloses Öl.



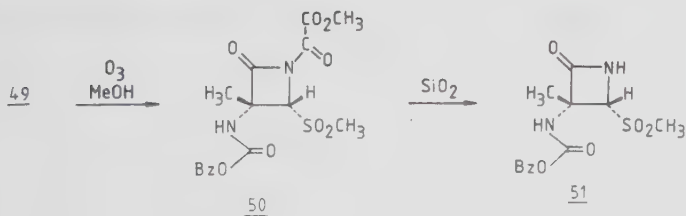
Die Oxidation von 46 mit m-Chlorperbenzoesäure bei -10°C ergab in guter Ausbeute das kristalline (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillansäuremethylester-S-dioxid (47).



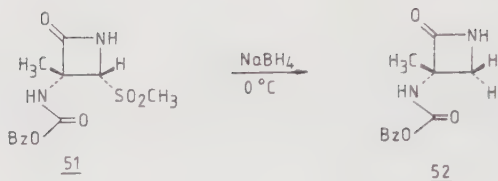
Nach DBU-Zugabe zu 47 und 30-minütigem Rühren bei Raumtemperatur fand sich im Dünnschichtchromatogramm nur noch ein UV-aktiver Fleck auf der Startlinie, was auf eine vollständige Umsetzung von 47 zum Salz (48) hindeutete. Die Zugabe von Methyljodid bei -30°C lieferte 86% des 2-[(3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methylsulfonylazetidin-2-onyl]-2-methylbut-2-ensäuremethylesters (49).



49 wurde in Methanol bei -30°C der Ozonolyse unterworfen. Nach der chromatographischen Reinigung des Ozonolyseproduktes (50) erhielt man sofort das gewünschte, hydrolysierte (3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methylsulfonyl-azetidin-2-on (51) in guter Ausbeute.



Die Reduktion von 51 mit Natriumborhydrid in Isopropanol/ Wasser bei 0°C lieferte nach säulenchromatigraphischer Reinigung 84% des kristallinen (3R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methylazetidin-2-ons (52).



Die nächsten Schritte, d. h. die Einführung der Sulfonat-
gruppe am β -Lactamstickstoff mittels eines SO_3 -Komplexes
und anschließende Abspaltung der Benzoxycarbonylschutz-
gruppe, sowie die Variation der 3-Acylaminoseitenketten,
erübrigten sich, wie bereits erwähnt. Die bakteriologi-
schen Tests waren ja schon durchgeführt worden ²³⁾.

Sie deuteten allerdings nicht in dieselbe Richtung wie es
bei den in dieser Arbeit am Penemsystem durchgeführten
Untersuchungen der Fall war. Am Monobactamgerüst bestätig-
te sich also die Theorie von Strominger und Tipper nicht.

5. Ausblick

Die neuen β -Lactamantibiotika besitzen ein sehr breites Wirkungsspektrum und stellen einen gewaltigen Fortschritt bei der Bekämpfung lebensbedrohender Infektionen dar. Dennoch wird es ein ideales Antibiotikum wohl kaum geben, zumal die Bakterien immer neue Verteidigungsstrategien entwickeln und sich so auf jede Bekämpfungsmethode einzustellen vermögen.

Die durch gramnegative Erreger oder Pseudomonaden hervorgerufenen, chronischen Infektionen nehmen im Gegensatz zu früher an Häufigkeit zu. Dazu kommt noch, daß die teil- oder vollsynthetischen, d. h. die nicht-klassischen, β -Lactamantibiotika chemisch sehr aufwendig herzustellen sind, besonders im großtechnischen Maßstab. Man ist also gehalten, sich enzymatischer und leicht durchführbarer, stereoselektiver Methoden zu bedienen.

Durch die Weiterentwicklung der Gentechnologie sollte es möglich sein, mit Hilfe von Mikroorganismen Antibiotika in größeren Ausbeuten oder sogar völlig neue herstellen zu lassen.

Experimenteller Teil

6. Allgemeines

6.1. Physikalische Meßgeräte

^1H -NMR-Spektren:

WP 80 (Hersteller Bruker). Alle Spektren wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard ($\delta = 0$ ppm) gemessen und nach erster Ordnung ausgewertet.

WP 200 der Firma Bruker.

IR-Spektren:

IR-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer. Die Angabe der Banden erfolgte nach fallenden Wellenzahlen (cm^{-1}); es bedeuten: s = stark, m = mittel, w = schwach, br = breit; Def. = Deformationsschwingung, oop = out of plane. Alle Spektren wurden in Methylenchlorid aufgenommen.

Massenspektrometer:

MS 902 (Hersteller AEI, Manchester).

Polarimeter:

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter der Firma Carl Zeiss.

UV-Spektren:

Spektralphotometer DMR 10 der Firma Carl Zeiss. Zur Aufnahme von kinetischen Messungen wurde das UV/VIS-Spektrometer Lambda 3 der Firma Perkin-Elmer in Verbindung mit dem Schreiber R 100 A (Hersteller Perkin-Elmer) verwendet.

Schmelzpunkte:

Schmelz- und Siedepunkte sind nicht korrigiert.

6.2. Lösungsmittel

Die Trocknung und Reinigung von Lösungsmitteln erfolgte, wie z. B. beim Ethanol, nach Routinevorschriften. Tetrahydrofuran, Benzol, Toluol, Chloroform, Dioxan und Methylenchlorid ließ man kurz vor Gebrauch eine Chromatigraphiesäule mit basischem Aluminiumoxid passieren. Diethylether wurde über basischem Aluminiumoxyd filtriert und durch Einpressen von Natrium wasserfrei erhalten. Glyme wurde über Lithiumaluminiumhydrid rückflußgeköcht und frisch abdestilliert.

6.3. Präparative Methodik

Auf die Beschreibung von Standardapparaturen wird verzich-

tet. Als Schutzgas dienten Stickstoff oder Spezialargon der Firma Linde. Der zur Ozonolyse verwendete Sauerstoff wurde über CaCl_2 vorgetrocknet.

Eingesetzt wurde der Laborozonisator 300 der Firma Sander, welcher bei einer Flußgeschwindigkeit von 50 l/h und einer Spannung von 5 kV 7 mmol Ozon pro Stunde lieferte.

Weiterhin wurde stäbchenförmiges Molekularsieb der Firma Union Carbide mit einem Porendurchmesser von 4 Å verwendet.

6.4. Chromatographische Verfahren

Für die analytische Dünnschichtchromatographie dienten Kieselgelplatten oder -folien der Firma Merck (Kieselgelfertigplatten 60 F₂₅₄ Schichtdicke 0.25 mm). Größere Stoffmengen wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit der Korngröße von 0.063 - 0.200 mm (70 - 230 mesh ASTM) der Firma Merck (Aktivitätsstufe I) gereinigt. In speziellen Fällen erfolgte die Chromatographie bei tiefer Temperatur in einer Spezialsäule mit Kühlmantel.

6.5. Kinetikmessungen

6.5.1. Herstellung des Phosphatpuffers

Zur Herstellung der biologischen Pufferlösung mit pH 7.4 wurden 9.62 g (0.054 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 1.72 g (0.013 mol) KH_2PO_4 in destilliertem Wasser gelöst und das Volumen bei 20 °C genau auf einen Liter eingestellt.

6.5.2. Kinetikmessung und Bestimmung der Halbwertszeit

Eine frisch bereitete, etwa 10^{-4} molare Penemcarbonsäurelösung wurde in biologischem Puffer gelöst. Die Aufnahme des UV-Spektrum erfolgte in einer 1 cm-Quarzküvette in einem thermostatisierten Wasserbad zwischen 36.8 °C und 37.2 °C, bis die Extinktion bei $\epsilon = 298$ nm konstant blieb, was nach ca. 7 Halbwertszeiten der Fall war. Die Halbwertszeit der jeweiligen Penemcarbonsäure mittelte man aus den ersten 5 Halbwertszeiten der Kinetikkurve, soweit sie reproduzierbar waren.

6.6. Herkunft der eingesetzten Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, sowie die Lösungsmittel Tetrahydrofuran, Benzol und Glyme, wurden von den Firmen Fluka, Merck und Janssen bezogen.

6.7. Bakterielle Tests

6.7.1. Verwendetes Material

Nährlösung:

DIFCO Bacto Nutrient Broth dehydrated enthält pro Liter
3 g Bacto-Beef-Extrakt, 5 g Bacto-Pepton ($\text{pH} = 6.8 \pm 0.2$ /
25 °C.

Agar:

DIFCO Bacto Nutrient Agar dehydrated enthält pro Liter
3 g Bacto-Beef-Extrakt, 5 g Bacto-Pepton und 15 g Bacto-
Agar.

Bakterien:

Escherichia coli DSM 1103

Escherichia coli W 3110 (RGK) produziert TEM 1 Lactamase.

Pseudomonas aeruginosa DSM 1117

Staphylococcus aureus DSM 1104

Staphylococcus aureus ATCC 29213 produziert schwach β -Lacta-
mase.

Staphylococcus aureus 23824 produziert β -Lactamase.

Staphylococcus aureus 012484/77 produziert β -Lactamase.

Zum Vergleich mit synthetisierten β -Lactamen wurde noch
Sulbactam als β -Lactamasehemmstoff eingesetzt.

6.7.2. Test-Durchführung

6.7.2.1. Aktivitätstest auf Bakterienagar

Es wurden ausschließlich bei 170 °C sterilisierte Geräte und originalverpackte Petrischalen verwendet.

Unter keimfreien Bedingungen wurden nach Vorschrift die Agar-Testplatten hergestellt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einer Nährlösung durch Bebrüten im Trockenschrank bei 37 °C.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden mittels sehr saugfähiger Filzfilterblättchen auf den Bakterienagar aufgebracht. Es wurden, wenn möglich, immer 30 µl einer 0.5 %-igen Antibiotikumlösung aufgetragen. Vergleichssubstanzen wurden jeweils in destillativ gereinigtem Dimethylsulfoxid gelöst. Die Testplatten wurden über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C bebrütet. Gemessen wurde zur Bestimmung der Aktivität der Durchmesser der Hemmhöfe.

6.7.2.2. Bestimmung der MHK-Werte

Dafür wurden Bakterienlösungen mit folgenden Keimzahlen eingesetzt:

- Staphylococcus aureus DSM 1107 640000 Keime/ml
- Staphylococcus aureus ATCC 29213 750000 Keime/ml

- Staphylococcus aureus 012484/77 750000 Keime/ml

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe des zu testenden Antibiotikums in Bakteriennährlösung in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0.5 µg/ml erstellt. Die auf diese Weise vorbereiteten Kulturgläschen wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet. Eine Trübung zeigte das Bakterienwachstum an (siehe Foto 4).

7. Synthese wichtiger Ausgangsmaterialien

7.1. Weinsäure-di-p-nitrobenzylester

Zu 30 g (0.20 mol) L-(+)-Weinsäure, die in 200 ml absolutem Dimethylformamid gelöst war, wurden 56 ml absolutes Triethylamin gegeben. Unter Rühren ließ man eine Lösung von 86.4 g (0.40 mol) p-Nitrobenzylbromid in 200 ml absolutem Dimethylformamid zufließen. Während 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur fiel ein farbloser Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde mit 3 l Benzol in einen Erlenmeyerkolben überführt und unter heftigem Rühren mit 1 l destilliertem Wasser versetzt, wobei das Tartrat ausfiel. Dieses wurde nun abgesaugt, mit Benzol und Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das ergab 67 g (80%) eines farblosen, amorphen Feststoffes.

7.2. Fumarsäure-di-p-nitrobenzylester

Zu einer Suspension von 16 g (0.10 mol) Dinatriumfumarat in 150 ml absolutem Dimethylformamid wurden bei Raumtemperatur unter heftigem Rühren spatelweise 47.53 g (0.22 mol) p-Nitrobenzylbromid gegeben. Nach 12-stündigem Rühren bei einer Badtemperatur von 100 °C wurde der ausgefallenen Niederschlag abgesaugt, mit 1n HCl gewaschen und aus viel Methylenchlorid umkristallisiert, wobei 23.21 g (60%) farblose, in allen Lösungsmitteln schwer lösliche Kristalle erhalten wurden. Deren Trocknung erfolgte im Hochvakuum.

7.3. 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylester

7.3.1. Herstellung aus Weinsäure-di-p-nitrobenzylester

18.0 g (42.85 mmol) Weinsäure-di-p-nitrobenzylester wurden unter Rühren und Erwärmen in 360 ml absolutem Dioxan und 360 ml wasserfreiem Benzol gelöst und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur unter starkem Rühren mit 20.0 g (40.6 mmol) 85 - 90 %-igem Bleitetraacetat versetzt. Nach einstündigem Nachrühren bei Raumtemperatur fiel die KI-Stärke-Probe negativ aus. Filtration von einem unlöslichen Rückstand und Eindampfen des Filtrates im Vakuum-Rotationsverdampfer lieferten ein gelbes Öl. Dieses wurde in 700 ml Methylen-

chlorid, welches ca. 1% Methanol enthielt, gelöst und mit NaHCO_3 -Lösung/Wasser (1:1), sowie mit 3 %-iger NaHSO_3 -Lösung je einmal kräftig geschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Trocknen im Hochvakuum lieferte 20.0 g (91%) eines gelben Öls, das bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kristallisierte.

7.3.2. Herstellung durch Ozonolyse des Fumarsäure-di-p-nitrobenzylesters

Zu einer Lösung von 9.66 g (25.0 mmol) Fumarsäure-di-p-nitrobenzylester in einem Methylenchlorid /Methanol-Gemisch wurde 8 Stunden lang bei Raumtemperatur mit einer Einleitungsfritte im Überschuß Ozon eingeleitet. Nach Zugabe von 25 ml Dimethylsulfid zur Reduktion der Ozonolysezwischenprodukte wurde weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die chromatographische Reinigung des nach dem Eindampfen im Vakuum erhaltenen Rückstandes über 180 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch lieferte 4.53 g (81%) eines amorphen, farblosen Feststoffes. Die Trocknung erfolgte im Hochvakuum.

7.4. Diazomethan

In einem 1l-Dreihalskolben mit Thermometer, Tropftrichter und Destillationsbrücke wurden zu einer Lösung von 20.0 g KOH in 25 ml Wasser 87 ml Diglyme und 25 ml Ether gegeben. Die gelbe Lösung wurde mit einem vorgewärmten Wasserbad von 70 °C - 75 °C erwärmt, während man eine Lösung von 54.0 g (0.25 mol) p-Toluolsulfonylmethylnitrosamid in 315 ml Ether innerhalb von einer Stunde zutropfte. Das entstandene Diazomethan destillierte kontinuierlich in Ether ab. Anschließend wurden nochmal 100 ml Ether nachgegeben, bis das Destillat farblos war. Hinter die gut gekühlte Vorlage war nochmals eine Kühlfalle geschaltet, die zum Schluß auch noch etherische Diazomethanlösung enthielt. Beide Vorlagen wurden vereinigt, vom gefrorenen Wasser abdekantiert und bei -20 °C im Tiefkühlfach gut verschlossen aufbewahrt. Diese Reaktion lieferte 630 ml etherische Diazomethanlösung.

Die Titration ergab, daß in 7 ml Lösung 1.0 mmol Diazomethan enthalten war.

Während der Reaktion mit Diazomethan ist darauf zu achten, daß nur Teflonhülsen verwendet werden und keine Glasschliffe.

7.5. Phenoxyessigsäurechlorid

Ein Gemisch von 15.21 g (0.10 mol) Phenoxyessigsäure und

100 g = 64.2 ml (0.84 mol) Thionylchlorid wurden 4 Stunden unter Wasserausschluß bei einer Badtemperatur von 80 °C - 90 °C gerührt. Danach wurde fraktioniert destilliert. Zunächst wurde im Wasserstrahlvakuum bei einer Badtemperatur von 50 °C das überschüssige Thionylchlorid entfernt. Bei einer Badtemperatur von 130 °C - 140 °C wurde das Phenoxyessigsäurechlorid destilliert. Die farblose Flüssigkeit, die in einer Ausbeute von 12.35 g (72%) erhalten wurde, besaß einen der Literatur entsprechenden Siedepunkt von 96 °C/9 Torr.

8. Synthese der (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure (28)

8.1. 6-Benzylidenaminopenicillansäure

6.00 g (27.8 mmol) 6-Aminopenicillansäure und 13.0 g = 12.5 ml (138 mmol) Benzaldehyd wurden in 120 ml wasserfreiem Ethanol 15 Minuten bei einer Badtemperatur von 100 °C am Rückfluß gekocht. Die trübe, gelbe Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und der geringe unlösliche Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft und das zurückbleibende gelbe Öl bei 0 °C mit 50 ml Pentan versetzt. Dabei fiel ein gelber Niederschlag aus. Das überstehende Pentan wurde abdekantiert, der Niederschlag in einer Reibschale mit frischem

Pentan verrieben, anschließend abgesaugt und nochmals mit Pentan gewaschen. Das gelbe Pulver wurde bei 30 °C im Hochvakuum getrocknet. Das lieferte 7.31 g (87%) der gelben 6-Benzylidenaminopenicillansäure, die bei 125 °C unter Zersetzung schmilzt.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3000 w (arom. C-H); 2880 w (aliph. C-H); 2600 w (br. -OH der Carbonsäure); 1775 s (β -Lactam C=O); 1725 m (Carbonsäure C=O); 1645 m (C=N); 1590 w (arom. C=C); 1450 w (C-H Def.); 1375 w (CH_3 Def.); 1275 m, 1205 m, 1175 w, 1140 w, 1075 w, 1025 w (Aromaten); 878 w, 847 w, 830 w (C-H 00p).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.55 (s, 3H, 2- CH_3); 1.65 (s, 3H, 2- CH_3); 4.38 (s, 1H, 3-H); 5.38 (d, 1H, 5-H); 5.58 (d, 1H, 6-H); 7.56 (m, 5H, Phenyl); 8.53 (s, 1H, N=C-H).

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$ (304.37)

Ber.	C	59.19	H	5.30	N	9.20	S	10.53 %
Gef.	C	59.29	H	5.59	N	9.29	S	10.53 %

8.2. 6-Benzylidenaminopenicillansäuremethylester (9)

In einem 500 ml-Rundkolben mit Tropftrichter und Blasenähler wurden 5.00 g (16.0 mmol) 6-Benzylidenaminopenicillan-

säure in 20 ml wasserfreiem Ether suspendiert. Dazu wurden unter Rühren bei -15°C innerhalb von 30 Minuten 112 ml etherische 0.14m Diazomethanlösung zugetropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde die gelbe, leicht trübe Lösung mit 6 g MgSO_4 gerührt und anschließend durch ein Glasfilter filtriert. Das Eindampfen im Vakuum lieferte ein gelbes Öl, welches mit 50 ml wasserfreiem Ether versetzt und bei 0°C gerührt wurde, wobei der Methylester in farblosen Kristallen ausfiel. Diese wurden abgesaugt, nochmals mit wasserfreiem Ether gewaschen und anschließend im Hochvakuum zu einem analysenreinen, feinkristallinen Produkt mit einem Zersetzungspunkt von 163°C - 165°C getrocknet. Die Ausbeute betrug 3.04 g (60%). Der Ester besitzt einen R_f -Wert in Essigester von 0.7.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

2920 w (aliph. C-H); 1775 s (β -Lactam C=O); 1750 s (Ester C=O); 1580 w (arom. C=C); 1440 w (C-H Def.); 1355 w (CH_3 Def.); 1290 m, 1205 s, 1180 w, 1165 w, 1135 w, 1075 w, 1025 w, 1010 w, 988 w, 940 w (Aromaten); 848 w, 803 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.45 (s, 3H, 2- CH_3); 1.61 (s, 3H, 2- CH_3); 3.70 (s, 3H, Ester CH_3); 4.35 (s, 1H, 3-H); 5.30 (dd, $J = 5$ Hz und $J = 2$ Hz, 1H, 5-H); 5.55 (d, $J = 5$ Hz, 1H, 6-H); 7.50 (m, 5H, Phenyl); 8.51 (d, $J = 2$ Hz, 1H, N=C-H).

$C_{16}H_{18}O_3N_2S$ (318.40)

Ber.	C	60.36	H	5.70	N	8.80	S	10.07 %
Gef.	C	60.04	H	5.66	N	8.70	S	10.08 %

8.3. (6R)-6-Benzylidenamino-6-methylpenicillansäuremethyl-
ester (10)

In einem 250 ml-Rundkolben mit Tropftrichter und Thermometer wurden unter Stickstoff bei -45°C zu einer Lösung von 2.00 g (6.30 mmol) 6-Benzylidenaminopenicillansäuremethylester in 20 ml wasserfreiem Glyme zunächst unter Rühren 2.05 ml (32.8 mmol) Methyljodid und anschließend eine Lösung von 0.70 g (6.30 mmol) Kaliumtertiärbutoxyat in 25 ml wasserfreiem Glyme innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach 30-minütigem Nachrühren bei -45°C wurde das Reaktionsgemisch mit 160 ml Methylenchlorid verdünnt und sooft mit 5 %-iger NaCl-Lösung gewaschen, bis die wäßrige Phase einen pH-Wert von 6 erreicht hatte. Die gelbe organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert, im Vakuum eingedampft und der braune, ölige Rückstand über 65 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch chromatographiert. So erhielt man 1.09 g (52%) leicht beige, analysenreine Kristalle, die im Hochvakuum getrocknet wurden. Diese besaßen einen Schmelzpunkt von 73°C - 74°C und einen R_F -Wert in Essigester von 0.73.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

2900 w (aliph. C-H); 1770 s (br, β -Lactam C=O und Ester C=O); 1645 m (N=C); 1585 w (arom. C=C); 1435 w (C-H Def.); 1375 w (CH_3 Def.); 1295 m; 1250 m; 1220 s (=C-O-C); 1180 w, 1160 w, 1135 w, 1075 w, 1030 w, 1010 w, 980 w, 938 w (Aromaten); 900 w, 850 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.43 (s, 3H, 2- CH_3); 1.51 (s, 3H, 2- CH_3); 1.78 (s, 3H, 6- CH_3); 3.70 (2, 3H, Ester CH_3); 4.28 (s, 1H, 3-H); 5.28 (s, 1H, 5-H); 7.49 (m, 5H, Phenyl); 8.55 (s, 1H, N=C-H).

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$ (332.42)

Ber.	C	61.42	H	6.06	N	8.43	S	9.65 %
Gef.	C	61.51	H	6.06	N	8.44	S	9.66 %

8.4. (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12)

In einem 100 ml-Rundkolben wurden unter Rühren bei 0 °C 0.99 g (3.00 mmol) (6R)-6-Benzylidenamino-6-methylpenicillansäuremethylester in 30 ml Essigester und 0.63 g (3.30 mmol) p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zusammengegeben. Die Lösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wieder auf 0 °C abgekühlt. Daraufhin wurde der entstandene kristalline Niederschlag, das p-Toluolsulfonsäuresalz, abgesaugt und mit etwas Essigester gewaschen.

Die Kristalle wurden in 6 ml Wasser gelöst und mit 0.30 g NaHCO_3 versetzt, wobei sich Kohlendioxid entwickelte. Es wurde mehrmals mit Methylenchlorid extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Eindampfen im Vakuum erhielt man kristallines, freies Amin.

Das Essigesterfiltrat wurde zweimal mit Wasser extrahiert. Diese wäßrige Phase wurde mit Methylenchlorid gewaschen, mit NaHCO_3 versetzt und wie oben bereits beschrieben aufgearbeitet. Das so gewonnene Rohprodukt wurde über 13.5 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (1:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt. Nach dem Umkristallisieren aus Isopropanol erhielt man 0.39 g (56%) farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 97°C - 98°C . Der R_f -Wert in Essigester betrug 0.50.

$D = +219^\circ + 1^\circ$ ($c = 10.54$; Benzol).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3100 w (br. N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1775 s (β -Lactam C=O); 1755 s (Ester C=O); 1600 w; 1440 w (C-H Def.); 1370 w, 1355 w (CH_3 Def.); 1265 m (br); 1215 m (=C-O-C); 1180 w; 1135 w; 1080 w; 1030 w; 1000 w; 940 w.

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.48 (s, 3H, 2- CH_3); 1.59 (2s, 6H, 2- CH_3 und 6- CH_3); 1.85 (s, 2H, NH_2); 3.71 (s, 3H, Ester CH_3); 4.36 (s, 1H, 3-H); 5.18 (s, 1H, 5-H).

$C_{10}H_{16}O_3N_2S$ (244.31)

Ber.	C	49.16	H	6.60	N	11.47	S	13.12 %
Gef.	C	49.25	H	6.46	N	11.35	S	13.12 %

8.5. (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäure-
methylester (13)

Eine Lösung von 1.00 g (4.10 mmol) (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12) in 15 ml absolutem Tetrahydrofuran wurde auf -20°C abgekühlt und unter Stickstoff mit 60 g Dimethylaminopyridin versetzt. Anschließend wurden langsam 0.77 g = 621.6 μl (4.50 mmol) Phenoxyessigsäurechlorid zugetropft. Nach 5 Stunden Rühren bei -20°C wurde mit 150 ml Methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit 0.1n HCl, NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und abfiltriert. Nach dem Eindampfen im Vakuum erhielt man ein gelbes Öl, welches über 47 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt wurde. So wurde eine Ausbeute von 1.48 g (95%) an analysenreinen, farblosen Kristallen mit einem Schmelzpunkt von 78°C - 79°C erhalten. Der R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) betrug 0.69.

Für die darauffolgende Oxidation konnte das ungereinigte, ölige Rohprodukt eingesetzt werden.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1775 s (β -Lactam C=O); 1750 s (Ester C=O); 1690 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1495 s (Amid II); 1440 m (C-H Def.); 1350 w (CH_3 Def.); 1300 m; 1215 s (=C-O-C); 1180 w, 1150 w, 1135 w, 1080 w, 1060 w, 1040 w, 1000 w, 960 w, 945 w (Aromaten); 880 w, 840 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.35 (s, 3H, 2- CH_3); 1.40 s, 3H 2- CH_3); 1.76 (s, 3H, 6- CH_3); 3.63 (s, 3H, Ester CH_3); 4.31 (s, 1H, 3-H); 4.38 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.33 (s, 1H, 5-H); 7.00 (m, 6H, Phenyl und N-H).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ (378.46)

Ber.	C	57.13	H	5.86	N	7.40	S	8.74 %
Gef.	C	57.32	H	5.83	N	7.30	S	8.51 %

8.6. Zwei isomere (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-oxide (14 a/b)

Zu einer Lösung von 296.0 mg (0.78 mmol) (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester (13) in 6 ml wasserfreiem Methylenchlorid wurden unter Rühren bei 0 °C 142.6 mg (0.75 mmol) m-Chlorperbenzoesäure spatelweise zugegeben. Nach einstündigem Rühren bei -10 °C wurde mit Methy-

8.7. (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäure-
methylester-S-dioxid (15)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.26 mmol) (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester (13) in 2.0 ml absolutem Methylenchlorid wurden bei -10°C 108.8 mg (0.57 mmol) 90 %-ige m-Chlorperbenzoesäure spatelweise zugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde mit Methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit NaHCO_3 -Lösung, 10 %-iger NaHSO_3 -Lösung und wieder mit NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Zum Schluß wurde die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Das gab einen farblosen, amorphen Feststoff, welcher über 8 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1), dann (2:1) als Fließmittelgemisch gereinigt wurde. Man erhielt 37.1 mg (35%) des analysenreinen Sulfons, das in Toluol/Essigester (1:1) einen R_f -Wert von 0.41 aufwies.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3380 m (Amid N-H); 2920 w (aliph. C-H); 1810 s (β -Lactam C=O); 1760 s (Ester C=O); 1700 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1515 s (Amid II); 1500 s (arom C=C); 1440 m (C-H Def.); 1340 s (O=S=O); 1295 w (Aromaten); 1225 s (=C-O-C); 1175 m, 1160 w; 1125 m (O=S=O); 1085 m (=C-O-C); 1065 w, 1020 w, 950 w (Aromatem); 923 w, 865 w, 842 w, 819 w, 788 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.39 (s, 3H, 2- CH_3); 1.55 (s, 3H, 2- CH_3); 1.89 (s, 3H, 6- CH_3); 3.75 (s, 3H, Ester CH_3); 4.41 (s, 1H, 5-H); 4.48 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.71 (s, 1H, 3-H); 7.06 (m, 6H, Phenyl und N-H).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$ (410.46)

Ber.	C	52.67	H	5.40	N	6.82	S	7.81 %
Gef.	C	52.78	H	5.74	N	6.73	S	7.86 %

8.8. (2R)-2-[(1R, 5R)-4,7-Diaza-5-methyl-6-oxo-3-phenoxy-methyl-2-thia-bicyclo[3.2.0]hept-3-enyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (18)

Zu einer Lösung von 1 g (2.53 mmol) des Gemisches der beiden isomeren (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-oxide (14 a/b) in 30.6 ml absolutem Benzol wurden 3.44 ml (34 mmol) Essigsäureanhydrid und 1.27 ml = 1.34 g (10.8 mmol) Trimethylphosphit gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Tage bei einer Ölbadtemperatur von 100 °C unter Feuchtigkeitsschluß rückflußgekocht. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten mit Toluol/Essigester ((1:1) als Laufmittelgemisch verfolgt. Als die Reaktion beendet war, wurde im Vakuum eingedampft und der gelbe, ölige Rückstand über 50 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (7:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch

aufgetrennt. So isolierte man zum einen dieses Thiazolinderivat, welches in 222.9 mg (24%) Ausbeute als öliges Nebenprodukt erhalten wurde. Trotz mehrmaliger chromatographischer Reinigung war eine richtige CH-Analyse nicht möglich. Der R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) betrug 0.45.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (=C-H); 2900 w (aliph. C-H); 1785 s (β -Lactam C=O); 1750 s (Ester C=O); 1680 m (C=N); 1605 m (C=C); 1505 s (arom. C=C); 1440 m (C-H Def.); 1380 m (CH_3 Def.); 1330 w, 1245 w, 1210 m, 1180 w, 1155 w, 1125 w, 1090 w, 1070 w, 1000 w, 972 m, 955 m, 920 m (Aromaten); 898 w, 840 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.60 (s, 3H, 6- CH_3); 1.73 (breites s, 3H, 3- CH_3); 5.71 (s, 3H, Ester CH_3); 4.64 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.74 (m, 3H, Vinyl CH_2 und 2-H des Butensäureesters); 5.88 (s, 1H, 2-H am β -Lactam); 7.05 (m, 5H, Phenyl).

8.9. (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetoxy-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (17)

In derselben Reaktion, die unter Punkt 8.8. das Thiazolin als Nebenprodukt lieferte, erhielt man 150 mg (15%) des schwer zu reinigenden (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetoxy-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäure-

methylester (17), ebenfalls ein Nebenprodukt. Der R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) betrug 0.30.

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.48 (s, 3H, 3- CH_3); 2.05 (s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure);
2.26 (s, 3H, Acetyl CH_3); 3.65 (s, 3H, Ester CH_3); 4.36
(s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.95 (m, 3H, $=\text{CH}_2$ und 2-H der Buten-
säure); 6.29 (s, 1H, 4-H); 7.00 (m, 6H, Phenyl und N-H).

8.10. (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxy-
acetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäureme-
thylester (16)

Zu einer Lösung von 1 g (2.53 mmol) des Gemisches der beiden isomeren (6R)-6-Methyl-6-phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester-S-oxide (14 a/b) in 30.4 ml absolutem Benzol wurden 3.44 ml (34.0 mmol) Essigsäureanhydrid und 1.27 ml = 1.34 g (10.8 mmol) Trimethylphosphit gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei einer Ölbadtemperatur von 100 °C zwei Tage unter Feuchtigkeitsausschluß rückflußgekocht, wobei das kondensierte Lösungsmittel durch einen mit Molekularsieb gefüllten Tropftrichter in den Reaktionskolben zurückgelangte. Danach wurde im Vakuum eingedampft und der ölige, gelbe Rückstand über 30 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (7:1) als Fließmittelgemisch chromatographiert. Dieses Vorgehen lieferte 562.4 mg (53%) farblose, analysenreine Kristalle mit einem

Schmelzpunkt von 98 °C - 100 °C und einem R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) von 0.38.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1797 s (β -Lactam C=O); 1750 s (Ester C=O); 1705 m (S-C=O); 1605 w (arom. C=C); 1525 m (Amid II); 1500 m (arom. C=C); 1445 w (C-H Def.); 1350 m (O=S=O); 1230 m (=C-O-C); 1210 m, 1180 w, 1140 m, 1110 m, 1065 w, 955 w (Aromaten); 920 w, 830 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.71 (s, 3H, 3- CH_3); 1.89 (breites s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure); 2.15 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 3.69 (s, 3H, Ester CH_3); 4.43 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.83 (breites s, 2H, Vinyl CH_2 der Butensäure); 4.95 (m, 1H, 2-H der Butensäure); 5.73 (s, 1H, 4-H); 6.53 (breites s, 1H, N-H); 7.03 (m, 5H, Phenyl).

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ (420.49)

Ber.	C	57.13	H	5.75	N	6.66	S	7.63 %
Gef.	C	57.06	H	5.75	N	6.45	S	7.65 %

Hochaufgelöstes Massenspektrum:

Ber. 420.13551

Gef. 420.1355

8.11. 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamido-
azetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethylester (19)

541.2 mg (1.29 mmol) (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (16) wurden in 10 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und mit 103 µl Triethylamin versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde mit Methylenchlorid verdünnt, dreimal mit 1n HCl extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft. Dies lieferte 532.4 mg (98%) des isomerisierten Produktes 19 in Form eines farblosen, stabilen Schaumes, der im Hochvakuum getrocknet wurde. Der R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) betrug 0.38.

Dieses analysenreine Rohprodukt konnte ohne weitere Reinigung in die darauffolgende Ozonolysereaktion eingesetzt werden.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3380 w (Amid N-H); 3000 w (arom. C-H); 2900 w (aliph. C-H); 1795 s (β-Lactam C=O); 1745 s (S-C=O und Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1525 s (Amid II); 1503 s (arom. C=C); 1440 w (C-H Def.); 1395 m, 1375 m (CH_3 Def.); 1295 w; 1230 s (=C-O-C); 1185 w, 1130 w, 1090 m (Aromaten); 1060 m (=C-O-C); 990 w, 960 w (Aromaten), 910 w, 838 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.77 (s, 3H, 3- CH_3); 2.16 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 2.20 (s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure); 2.24 (s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure); 3.75 (s, 3H, Ester CH_3); 4.48 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.64 (s, 1H, 4-H); 6.58 (breites s, 1H, N-H); 7.06 (m, 5H, Phenyl).

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ (420.49)

Ber.	C	57.13	H	5.75	N	6.66	S	7.63 %
Gef.	C	57.37	H	5.75	N	6.43	S	7.65 %

8.12. 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (20)

In eine Lösung von 703 mg (1.67 mmol) 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethylester (19) in 45 ml Methanol wurde bei -30°C über eine Einleitungsfritte zwei Stunden lang Ozon im Überschuß, eingeleitet. Manchmal war sogar eine Blaufärbung der Lösung zu beobachten. Dann wurde im kalten Wasserbad im Vakuum eingedampft und der farblose, ölige Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Die organische Phase wurde mehrmals mit 10 %-iger NaHSO_3 -Lösung extrahiert und mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Das anschließende Trocknen über MgSO_4 und Eindampfen des Filtrates im Vakuum lieferte 627.7 mg (95%) eines farblosen, analysenreinen Feststoffes,

der im Hochvakuum getrocknet wurde.

Dieses Produkt 20 konnte ungereinigt in die darauffolgende Methanolyse eingesetzt werden.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 m (Amid N-H); 3000 w (arom. und aliph. C-H); 1850 s (β-Lactam C=O); 1795 s, 1725 s (Ester und Amid C=O); 1615 m (arom. C=C); 1525 s (Amid II); 1500 s (arom. C=C); 1445 w (C-H Def.); 1375 w; 1235 s (=C-O-C); 1190 w, 1160 w, 1125 w, 1100 w, 1075 w, 1020 w, 965 w (Aromaten); 878 w, 840 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.75 (s, 3H, 3- CH_3); 2.26 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 3.83 (s, 3H, Ester CH_3); 4.50 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.75 (s, 1H, 4-H); 7.05 (m, 6H, Phenyl und N-H).

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$ (394.41)

Ber.	C	51.77	H	4.60	N	7.10	S	8.13 %
Gef.	C	51.70	H	4.37	N	6.82	S	8.16 %

8.13. (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamido-azetidin-2-on (21)

1.68 g (4.26 mmol) des 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethyl-

ester (20) wurden in 227 ml Methanol, welches 2 % Wasser enthielt, und 9.1 ml Aceton gelöst. Nach 15-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde im Vakuum eingedampft, mehrmals mit Ether gewaschen und erneut eingedampft, so daß das enthaltene Wasser weitgehend entfernt war. Der Rückstand, ein farbloser Feststoff, wurde über 65 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch chromatographiert. So erhielt man als Hauptprodukt 1.07 g (79%) des farblosen, amorphen Azetidinons 21 mit einem R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) von 0.1.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (2 Amid N-H); 3000 w (arom. und aliph. C-H); 1825 s (β -Lactam C=O); 1725 s (Ester C=O); 1625 m (Amid C=O); 1540 s (Amid II); 1520 s (arom. C=C); 1450 w (C-H Def.); 1400 w; 1370 w, 1300 w (CH_3 Def.); 1245 m (=C-O-C); 1195 m, 1150 m, 1125 m, 1095 w, 1075 m, 1000 w, 960 w (Aromaten); 920 w, 850 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.74 (s, 3H, 3- CH_3); 2.31 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 4.51 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.38 (s, 1H, 4-H); 7.06 (m, 7H, Phenyl und 2 N-H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ (308.36)

Ber.	C	54.53	H	5.23	N	9.08	S	10.40 %
Gef.	C	54.62	H	5.42	N	9.04	S	10.39 %

8.14. Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2- [(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl] -2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (24 a/b)

Ein Reaktionsgemisch aus 649 mg (2.10 mmol) (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on (21) und 1.01 g (4.20 mmol) 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylester (23) wurde zwei Tage in 15 ml absolutem Benzol bei einer Ölbadtemperatur von 110 °C derart rückflußgekocht, daß das kondensierte Lösungsmittel durch einen mit Molekularsieb gefüllten Tropftrichter in das Reaktionsgefäß zurückgelangte. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch in einem Laufmittelgemisch von Chloroform/Essigester(2:1) verfolgt. Der nach dem Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene gelbe, ölige Rückstand wurde über 40 g Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch von Toluol/Essigester (4:1) chromatographisch gereinigt. Dies lieferte 829.7 mg (76%) eines farblosen, schaumigen Diastereomerengemisches, das im Hochvakuum getrocknet wurde. Der R_F -Wert in Chloroform/Essigester (2:1) betrug 0.08.

Spektren des Diastereomerengemisches:

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3440 w (O-H); 3350 m (Amid N-H); 3000 w (arom. C-H); 2950 w (aliph. C-H); 1795 s (β -Lactam C=O); 1755 s, 1715 s (Ester C=O); 1600 m (arom. C=C); 1440 w (C-H Def.); 1350 s (N-O);

1280 w; 1230 s (=C-O-C); 1175 w, 1130 w (Aromaten); 1100 m (=C-O-C); 1065 w, 1020 w, 960 w (Aromaten); 853 w, 840 w (1,4-disubstituierter Benzolring).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.68 (s, 3H, 3- CH_3); 1.74 (s, 3H, 3- CH_3); 2.19 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 2.28 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 4.44 (s, 4H zwei Phenoxy CH_2); 5.30 (m, 4H, zwei p-Nitrobenzyl CH_2); 5.45 (m, 4H, zwei 4-H am β -Lactam und zwei 2-H der Essigsäure); 6.63 (breites s, 2H, zwei N-H); 7.49 (m, 18H, zwei p-Nitrobenzyl und zwei Phenyl).

$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_9\text{N}_3\text{S}$ (517.52)

Ber.	C	53.38	H	4.48	N	8.12	S	6.20 %
Gef.	C	52.91	H	4.48	N	8.14	S	6.21 %

8.15. Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (25 a/b)

8.15.1. Reaktion mit Thionylchlorid und Poly-Hünigbase

Zu 6.00 g Poly-Hünigbase, die man 12 Stunden unter Stickstoff in 27 ml absolutem Tetrahydrofuran quellen ließ, wurden 1.53 g (3.00 mmol) des ebenfalls in 30 ml wasserfreiem

Tetrahydrofuran gelösten Diastereomerengemisches der 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (24 a/b) gegeben. Nach der Zugabe von 1.08 ml = 1.89 g (15.6 mmol) Thionylchlorid unter kräftigem Rühren bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch 6 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abfiltrieren der Poly-Hünigbase und Eindampfen des Tetrahydrofurans im Vakuum wurde der rote, ölige Rückstand mit Methylenchlorid verdünnt, einmal mit 0.1n HCl extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft und das daraus erhaltene gelbe Öl sofort, ohne weitere Reinigung, in die darauffolgende Synthese des Phosphorans eingesetzt.

Statt Tetrahydrofuran konnte ebensogut absolutes Dioxan als Lösungsmittel verwendet werden.

8.15.2. Reaktion mit Thionylchlorid und Triethylamin

Zu einer Lösung von 829.7 mg (1.60 mmol) der beiden diastereomeren 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (24 a/b) in 15 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden unter Stickstoff bei -60 °C unter kräftigem Rühren zunächst 209.4 µl = 341.2 mg (3.20 mmol) Thionylchlorid und dann 446.4 µl = 324.0 mg (3.20 mmol) Triethylamin getropft. Daraufhin wur-

de noch zwei Stunden bei -60°C gerührt und das Reaktionsgemisch weitere 12 Stunden unter Stickstoff im Tiefkühlfach bei -18°C stengelassen. Nach dem Dünnschichtchromatogramm in Chloroform/Essigester (2:1) war die Reaktion danach abgeschlossen. Daher wurde mit Methylenchlorid verdünnt, mehrmals mit 0.1n HCl extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase im Vakuum wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der dabei entstandene, im Hochvakuum getrocknete, farblose Schaum wurde sofort zur Darstellung des Phosphorans eingesetzt. Es war allerdings auch möglich das Rohprodukt über Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch zu reinigen. Man erhielt dann im Dünnschichtchromatogramm mit Chloroform/Essigester (2:1) zwei übereinanderliegende Flecken der beiden Diastereomeren mit den R_f -Werten von 0.36 und 0.39.

Spektren des Diastereomerengemisches:

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1798 s (β -Lactam C=O); 1775 s (Ester C=O); 1700 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1520 s (N-O); 1500 m (arom. C=C); 1350 s (N-O); 1225 s, 1210 s (C-O); 1175 m, 1130 m, 1110 m, 1085 w, 1055 w, 930 w (Aromaten); 850 w, 840 w (1,4-disubstituierter Benzolring); 820 w (C-Cl).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.68 (zwei s übereinander, 6H, zwei 3- CH_3); 2.13 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 2.25 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 4.43 (zwei s, 4H, zwei Phenoxy CH_2); 5.20 (s, 2H, p-Nitrobenzyl CH_2); 5.28 (s, 2H, p-Nitrobenzyl CH_2); 5.51 (s, 1H, 4-H); 5.63 (s, 1H, 4-H); 6.00 (s, 1H, 2-H der Essigsäure), 6.15 (s, 1H, 2-H der Essigsäure); 6.55 (breites s, 2H, zwei N-H); 7.01 (m, 10H, zwei Phenyl); 7.76 (m, 8H, zwei p-Nitrobenzyl).

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{N}_3\text{SCl}$ (535.96)

Ber.	C	51.54	H	4.14	N	7.84	S	5.98 %
Gef.	C	51.73	H	4.22	N	8.02	S	5.98 %

8.16. 2-[(3R,4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphoranylidenessigsäure-p-nitrobenzylester (26)

857.6 mg (1.60 mmol) der beiden ungereinigten diastereomeren 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (25 a/b) und 927.3 mg (4.02 mmol) Triphenylphosphin wurden in 1.27 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und unter Stickstoff 5 Tage bei 2 °C im Kühlschrank unter Feuchtigkeitsausschluß stehen gelassen. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Essigester (2:1) als Laufmittelge-

misch verfolgt. Am Ende der Reaktion wurde mit Methylenchlorid verdünnt und mehrmals sorgfältig mit 10 %-iger Na_2CO_3 -Lösung extrahiert und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 wurde das Filtrat im Vakuum eingedampft. Die chromatographische Reinigung des öligen, gelben Rückstandes über 70 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch ergab 888.4 mg (73%) eines leicht gelben, amorphen, analysenreinen Feststoffes, der im Hochvakuum getrocknet wurde. Der R_f -Wert in Chloroform/Essigester (2:1) betrug 0.12. Die Ausbeute über 3 Stufen, d.h. einschließlich der Addition des 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylesters (23), war 56%.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1760 s (β -Lactam C=O); 1700 s (Ester C=O); 1625 m (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1525 s (N-O); 1500 m (arom. C=C); 1430 w (C-H Def.); 1350 s (N-O); 1290 w; 1240 m (=C-O-C); 1205 w; 1110 m (=C-O-C); 1085 w, 1000 w, 960 w (Aromaten); 855 w (1,4-disubstituierter Benzolring).

$\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_3\text{SP}$ (761.80)

Ber.	C	64.64	H	4.76	N	5.52	S	4.21 %
Gef.	C	64.77	H	4.90	N	5.35	S	4.21 %

8.17. (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure-p-nitrobenzylester (27)

300 mg (0.39 mmol) 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-methyl-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphoranylidene-sigsäure-p-nitrobenzylester (26) wurden in 270 ml wasserfreiem Toluol mit einer Spur Hydrochinon 6 Tage bei einer Badtemperatur von 80 °C unter Argon gerührt. Nachdem im Dünnschichtchromatogramm kein Edukt mehr vorhanden war, wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte mittels einer Tieftemperaturchromatographiesäule bei -30 °C über 45 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch. Dies lieferte einen blaßgelben, analysenreinen Feststoff in einer Ausbeute von 135.2 mg (72%), der noch im Hochvakuum getrocknet wurde. Der R_f -Wert in Toluol/Essigester (1:1) betrug 0.53. Dieser Penemcarbonsäureester (27) konnte gut im Tiefkühlfach bei ca. -20 °C unter wasserfreien Bedingungen aufbewahrt werden.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 w (Amid N-H); 2950 w (aliph. C-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1725 s (Ester C=O); 1700 s (Amid C=O); 1600 s (arom. C=C); 1530 s (N-O); 1500 s (arom. C=C); 1450 w (C-H Def.); 1350 s (N-O); 1325 s; 1240 m (=C-O-C); 1175 m; 1095 m (=C-O-C); 1075 w, 1055 w, 1025 w, 970 w, 920 w (Aromaten); 860 m (1,4-disubstituierter Benzolring).

^1H -NMR-Spektrum in CCl_4 (ppm):

1.75 (s, 3H, 6- CH_3); 2.30 (s, 3H, 2- CH_3); 4.39 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.18 (m, 2H, p-Nitrobenzyl CH_2); 5.58 (s, 1H, 5-H); 7.03 (m, 6H, Phenyl und N-H); 7.78 (m, 4H, p-Nitrobenzyl).

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_3\text{S}$ (484.50)

Ber.	C	57.14	H	4.38	N	8.69	S	6.63 %
Gef.	C	56.98	H	4.60	N	8.50	S	6.65 %

8.18. Kaliumsalz der (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure (28)

60 mg Palladium auf Aktivkohle wurden in 0.5 ml Essigester und 0.5 ml 0.1 molarer KHCO_3 -Lösung suspendiert und in einer Hydrierapparatur, die eine genaue Ablesung des Wasserstoffverbrauches zuließ, eine Stunde lang vorhydriert. Sodann wurde eine Lösung von 12 mg (0.025 mmol) (5R, 6R)-2,6-Dimethyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure-p-nitrobenzylester (27) in 0.5 ml Essigester durch ein Septum in das Reaktionsgefäß eingespritzt. Man hydrierte eine Stunde lang, dann wurde kein Wasserstoff mehr aufgenommen. Gemäß der Erwartungen waren 2.24 ml (= 4 Äquivalente) verbraucht worden. Das Palladium/Kohle-Gemisch wurde mittels einer Glasfritte abfiltriert und mit 2 ml Essigester und 0.5 ml 0.1 molarer KHCO_3 -Lösung gut gewaschen. Daraufhin wurde die wäßrige Phase sorgfältig abgetrennt und am Wasserstrahlvakuum von letzten Essigesterspuren

befreit.

Zur Bestimmung der Konzentration wurden 30 μ l der KHCO_3 -Lösung entnommen und für ein UV-Spektrum mit 3 ml Wasser verdünnt. Auf diese Weise wurde eine Ausbeute von 5.9 mg (68%) ermittelt.

UV-Spektrum in Wasser:

$\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5820$).

^1H -NMR-Spektrum in D_2O (ppm):

1.68 (s, 3H, 6- CH_3); 2.15 (s, 3H, 2- CH_3); 4.55 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.58 (s, 1H, 5-H); 7.05 (m, 5H, Phenyl); 8.40 (s, 1H, N-H).

9. Synthese der (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamidopenem-
3-carbonsäure (40) als Vergleichssubstanz

9.1. 6-Phenoxyacetamidopenicillansäure- β -S-oxid (29)

Zu einer Suspension von 69.0 g (0.20 mol) 6-Phenoxyacetamidopenicillansäure (1) in 200 ml Eisessig wurden bei 10 °C - 15 °C innerhalb von 70 Minuten 69.0 ml (0.40 mol) 20 %-ige H₂O₂-Lösung in Wasser getropft. Der feste Rückstand löste sich dabei auf. Die entstandene gelbe Lösung wurde mit einigen Impfkristallen versetzt, woraufhin das Produkt sofort auszukristallisieren begann. Das Reaktionsgemisch wurde noch 4 Stunden bei 10 °C - 15 °C nachgerührt, anschließend auf 0 °C abgekühlt und innerhalb 6 Minuten tropfenweise mit 200 ml Wasser versetzt. Nach dem Abfiltrieren des farblosen Niederschlages und Waschen mit 2 l Wasser und Trocknen bei 45 °C/ 12 Torr im Wasserstrahlvakuum im speziellen Trockenschrank wurde eine Ausbeute von 64.44 g (88%) erhalten.

IR-Spektrum in CH₂Cl₂ (cm⁻¹):

3400 m (Amid N-H); 3000 m (br, Säure O-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1690 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1510 m (Amid II); 1500 s (arom. C=C); 1440 m (C-H Def.); 1350 w (CH₃ Def.); 1280 m, 1180 w, 1140 w (Aromaten); 1060 s (S=O); 1020 w, 1005 w, 978 w (Aromaten); 878 w, 840 w, 815 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.18 (s, 3H, 2- CH_3); 1.60 (s, 3H, 2- CH_3); 4.43 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.55 (s, 1H, 3-H); 5.00 (d, $J = 4$ Hz, 1H, 5-H); 6.05 (dd, $J = 4$ Hz und $J = 8$ Hz, 1H, 6-H); 7.05 (m, 5H, Phenyl); 8.20 (breites d, $J = 8$ Hz, 1H, N-H).

9.2. 6-Phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester- β -S-oxid (30)

Zu einer Lösung von 64.44 g (0.18 mol) 6-Phenoxyacetamidopenicillansäure- β -S-oxid (29) in 300 ml absolutem Tetrahydrofuran in einem 2 l-Dreihalskolben mit Teflonhülsen, Tropftrichter und Blasenähler wurden ca. 540 ml einer etherischen Diazomethanlösung getropft (1mmol = 3 ml Lösung). Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde im Vakuum eingedampft. Dies ergab einen farblosen, kristallisierenden Schaum. Die Umkristallisation erfolgte aus Isopropanol. Die Ausbeute nach dem Trocknen im Hochvakuum betrug 60.50 g (90%) an farblosen Kristallen mit einem Schmelzpunkt von $122^\circ\text{C} - 125^\circ\text{C}$.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1755 s (Ester C=O); 1690 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1510 m (Amid II); 1500 s (arom. C=C); 1440 w (C-H Def.); 1350 w (CH_3 Def.); 1280 m; 1220 s (=C-O-C); 1180 w, 1140 w; 1080 m (=C-O-C); 1060 s (S=O); 1020 w, 1005 w, 978

w, 948 w (Aromaten); 878 w, 840 w, 815 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.18 (s, 3H, 2- CH_3); 1.60 (s, 3H, 2- CH_3); 3.71 (s, 3H, Ester CH_3); 4.43 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 4.98 d, $J = 4$ Hz, 1H, 5-H); 6.00 (dd, $J = 4$ Hz und $J = 8$ Hz, 1H, 6-H); 7.00 (m, 5H, Phenyl); 8.15 (breites d, $J = 8$ Hz, 1H, Amid N-H).

9.3. (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (31)

Eine Lösung von 25 g (66.0 mmol) 6-Phenoxyacetamidopenicillansäuremethylester- β -S-oxid (30), 99.0 ml (0.98 mol) Essigsäureanhydrid und 33.0 ml = 34.8 g (0.28 mol) Trimethylphosphit in 600 ml absolutem Benzol wurde 24 Stunden lang bei einer Ölbadtemperatur von 90 °C rückflußgekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft und der gelbe Rückstand über 840 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (7:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt. Das Einrotieren und Trocknen im Hochvakuum ergaben 15.56 g (58%) eines farblosen, stabilen Schaumes mit einem R_f -Wert von 0.33 in Toluol/Essigester (1:1).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1795 s (β -Lactam C=O); 1750 s (Ester C=O); 1705 s (S-C=O); 1605 w (arom.

C=C); 1525 m (Amid II); 1500 m (arom. C=C); 1445 w (C-H Def.); 1350 m (CH₃ Def.); 1230 m (=C-O-C); 1210 m, 1180 w (Aromaten); 1140 m; 1110 m (=C-O-C); 1065 w, 955 w (Aromaten); 920 w, 830 w (C-H oop).

¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ (ppm):

1.89 (breites s, 3H, 3-CH₃ der Butensäure); 2.15 (s, 3H, S-Acetyl CH₃); 3.69 (s, 3H, Ester CH₃); 4.56 (s, 2H, Phenoxy CH₂); 4.82 (breites s, 2H, Vinyl CH₂ der Butensäure); 5.09 (d, J = 0.8 Hz, 1H, 4-H); 5.57 (dd, J = 5 Hz und J = 8 Hz, 1H, 3-H); 6.53 (breites d, J = 5 Hz, 1H, N-H); 7.00 (m, 5H, Phenyl).

9.4. 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethylester (32)

Zu einer Lösung von 15.56 g (38.0 mmol) (2R)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-3-ensäuremethylester (31) in 304 ml absolutem Methylenchlorid wurden 3.04 ml Triethylamin gegeben. Nach 90-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 400 ml Methylenchlorid verdünnt und mehrmals mit 1N HCl extrahiert, sowie mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ und anschließender Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Ether gespült und wieder eingedampft.

Dies ergab nach dem Trocknen im Hochvakuum einen farblosen, stabilen Schaum in einer Ausbeute von 15.09 g (97%).

Der R_f -Wert in Toluol/Essigester betrug 0.30.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3380 w (Amid N-H); 3000 w (arom. C-H); 2900 w (aliph. C-H); 1795 s (β -Lactam C=O); 1745 s (S-C=O) und Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1525 s (Amid II); 1503 s (arom. C=C); 1440 w (C-H DEF.); 1395 m, 1375 m, 1295 w (Aromaten); 1230 s (=C-O-C); 1185 w, 1130 w, 1090 m (Aromaten); 1060 m (=C-O-C); 990 w, 960 w (Aromaten); 910 w, 838 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

2.16 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 2.20 (s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure); 2.24 (s, 3H, 3- CH_3 der Butensäure); 3.79 (s, 3H, Ester CH_3); 4.56 (s, 3H, Phenoxy CH_2); 5.45 (dd, $J = 5$ Hz und $J = 8$ Hz, 1H, 3-H); 5.93 (d, $J = 5$ Hz, 1H, 4-H); 6.90 (breites d, $J = 8$ Hz, 1H, N-H); 7.10 (m, 5H, Phenyl).

9.5. 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (33)

In eine Lösung von 8.63 g (21.2 mmol) 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-3-methylbut-2-ensäuremethylester (32) in 233 ml. Methanol wurde bei -40°C 4 Stunden lang Ozon eingeleitet (etwas im Überschuß). Dabei fielen

farblose Kristalle aus, die immer wieder abfiltriert wurden, um ein Verstopfen des Einleitungsrohres zu verhindern. Nach Beendigung der Reaktion wurde im kalten Wasserbad im Vakuum das Methanol abgezogen, der farblose, ölige Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen, mehrmals mit 10 %-iger NaHSO_3 -Lösung geschüttelt, mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und zum Schluß über MgSO_4 getrocknet. Das Eindampfen des Filtrates im Vakuum ergab einen farblosen Schaum, der aus Methanol kristallisierte. Die Gesamtausbeute betrug 4.04 g (50%) eines kristallinen Produktes 33, das im Hochvakuum getrocknet worden war, mit einem Schmelzpunkt von 145°C und einem R_f -Wert von 0.20 in Toluol/Essigester (1:1).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 m (Amid N-H); 3000 w (arom. und aliph. C-H); 1840 s (β -Lactam C=O); 1795 s, 1725 s (Ester und Amid C=O); 1615 m (arom. C=C); 1525 s (Amid II); 1500 s (arom. C=C); 1445 w (C-H Def.); 1375 m; 1235 s (=C-O-C); 1190 w, 1160 w, 1125 w, 1100 w, 1075 w, 1020 w, 965 w (Aromaten); 878 w, 840 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

2.27 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 3.92 (s, 3H, Ester CH_3); 4.58 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.60 (dd, $J = 6.2$ Hz und $J = 8.5$ Hz, 1H, 3-H); 5.95 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 4-H); 7.10 (m, 6H, Phenyl und N-H).

9.6. (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on
(34)

Ein Gemisch aus 4.00 g (10.4 mmol) 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-oxoessigsäuremethylester (33) in 44 ml Aceton, 1100 ml Methanol und 18 ml Wasser wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Sodann wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft, der Rückstand mehrmals mit kleinen Portionen Ether gespült und wieder einrotiert. Daraus ergaben sich 3.36 g (62%) farblose Kristalle, die aus Essigester/Benzol umkristallisiert wurden. Sie besaßen einen Schmelzpunkt von 138 °C - 141 °C und einen R_F -Wert von 0.20 in Toluol/Essigester (1:1).

Alle Mutterlaugen wurden gesammelt und zum Schluß über Kieselgel mit Toluol/Essigester (3:1), dann (2:1), chromatographisch gereinigt.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (2 Amid N-H); 3000 w (arom. und aliph. C-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1710 s (Ester C=O); 1625 m (Amid C=O); 1540 s (Amid II); 1520 s (arom. C=C); 1450 w (C-H Def.); 1400 w, 1370 w, 1300 w (CH_3 Def.); 1245 m (=C-O-C); 1195 m, 1150 m, 1125 m, 1095 w (Aromaten); 1075 m (=C-O-C); 920 w, 850 w (C-H oop).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

2.30 (s, 3H, S-Acetyl CH_3); 4.56 (s, 2H, Phenoxy CH_2);

5.62 (m, 2H, 4-H und 5-H); 7.12 (m, 7H, Phenyl und 2 N-H).

9.7. Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (36 a/b)

In einem 50 ml-Rundkolben wurde eine Lösung von 294 mg (1.00 mmol) (3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-on (34) und 482.4 mg (2.00 mmol) 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylester (23) in 10 ml absolutem Benzol unter Feuchtigkeitsausschluß bei 120 °C Badtemperatur zwei Tage lang rückflußgekocht, so daß das kondensierte Lösungsmittel über einen mit Molekularsieb gefüllten Tropftrichter in das Reaktionsgefäß zurücktropfte. Der ölige, gelbe, nach dem Eindampfen im Vakuum erhaltene Rückstand wurde mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch über 15 g Kieselgel chromatographisch gereinigt. Daraus resultierten 436.3 mg (87%) eines amorphen Produktes mit einem R_f -Wert von 0.25 (länglicher Fleck) in Toluol/Essigester (1:1). Das entstandene Diastereomerengemisch 36 a/b wurde sofort zur nun folgenden Reaktion mit Thionylchlorid eingesetzt.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 w (O-H); 3350 m (Amid N-H); 3000 w (arom. C-H); 2950 m (aliph. C-H); 1805 s (β -Lactam C=O); 1750 s, 1715 s (Ester

C=O); 1600 m (arom. C=C); 1440 w (C-H Def.); 1350 s (N-O); 1280 w; 1230 s (=C-O-C); 1175 w, 1130 w (Aromaten); 1100 m (=C-O-C); 1065 w, 1020 w, 960 w (Aromaten); 853 w, 840 w (1,4-disubstituierter Benzolring).

9.8. Diastereomerengemisch aus (2R)- und (2S)-2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (37 a/b)

Zu einer Lösung von 214.0 mg (0.43 mmol) des Diastereomerengemisches der 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-hydroxyessigsäure-p-nitrobenzylester (36 a/b) in 4 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran in einem 10 ml-Schlenk-
kolben wurden unter Stickstoff bei -60 °C nacheinander 92.02 mg = 56.33 µl (0.86 mmol) Thionylchlorid und 87.08 mg = 119.9 µl (0.86 mmol) Triethylamin zugetropft. Ein heller Niederschlag fiel sofort aus und das Gemisch färbte sich zunächst dunkelrot und nach 2-stündigem Rühren bei -60 °C gelb. Daraufhin wurde mit Methylenchlorid verdünnt, mehrmals mit 0.1n HCl und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Das Eindampfen des Filtrates im Vakuum lieferte ein blaßrosa Öl, welches sofort, ohne vorherige Reinigung, zur Darstellung des Phosphorans eingesetzt wurde. Im Dünnschichtchromatogramm waren eindeutig zwei Flecken der beiden Diastereomeren (37 a/b) zu beobachten mit einem R_f-Wert von 0.47 und 0.52 in Toluol/Essigester (1:1).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1795 s (β -Lactam C=O); 1775 s (Ester C=O); 1700 s (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1520 s (N-O); 1500 m (arom. C=C); 1350 s (N-O); 1225 s; 1210 s (=C-O-C); 1175 m, 1130 m (Aromaten); 1110 m (=C-O-C); 1085 w, 1055 w, 930 w (Aromaten); 850 w, 840 w (1,4-disubstituierter Benzolring).

9.9. 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphoranylidenessigsäure-p-nitrobenzylester (38)

Eine Lösung von 225.0 mg (0.43 mmol) der beiden diastereomeren 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-chloressigsäure-p-nitrobenzylester (37 a/b) und 249.4 mg (1.08 mmol) Triphenylphosphin in 0.34 ml absolutem Tetrahydrofuran wurde zwei Tage bei 2 °C im Kühlschrank unter Stickstoff bei Feuchtigkeitsausschluß stehengelassen. Als das Dünnschichtchromatogramm das Ende der Reaktion anzeigte wurde mit Methylenchlorid verdünnt, mehrmals sorgfältig mit 10 %-iger Na_2CO_3 -Lösung geschüttelt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Aus dem Eindampfen des Filtrates im Vakuum resultierte ein gelber, öliges Rückstand, der über 16 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt wurde. Die Ausbeute war 227.8 mg (71%) ei-

nes leicht gelben, amorphen Feststoffes mit einem R_f -Wert von 0.20 in Toluol/Essigester (1:1).

Über die letzten drei Stufen, einschließlich der Addition des 2-Hydroxy-2-methoxyessigsäure-p-nitrobenzylesters (23), wurde eine Gesamtausbeute von 60% erzielt.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2900 w (aliph. C-H); 1760 s (β -Lactam C=O); 1698 s (Ester C=O); 1625 m (Amid C=O); 1600 m (arom. C=C); 1525 s (N-O); 1500 m (arom. C=C); 1430 w (C-H Def.); 1350 s (N-O); 1290 w; 1240 m (=C-O-C); 1205 w; 1110 m (=C-O-C); 1085 w, 1000 w, 960 w (Aromaten); 855 w (1,4-disubstituierter Benzolring).

9.10. (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure-p-nitrobenzylester (39)

208.0 mg (0.28 mmol) 2-[(3R, 4R)-4-Acetylthio-3-phenoxyacetamidoazetidin-2-onyl]-2-triphenylphosphoranylidenessigsäure-p-nitrobenzylester (38) wurden in 210 ml wasserfreiem Toluol mit einer Spur Hydrochinon bei einer Badtemperatur von 80 °C unter Argon 5 Tage lang gerührt. Nachdem im Dünnschichtchromatogramm das Ende der Reaktion angezeigt worden war, wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand bei -30 °C über eine Tieftemperatursäule mit 35 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch chroma-

tographisch gereinigt. Daraus resultierten 42.2 mg (32%) eines blaßgelben, amorphen Feststoffes mit einem R_F -Wert von 0.52 in Toluol/Essigester (1:1).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 w (Amid N-H); 2950 w (aliph. C-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1725 s (Ester C=O); 1700 s (Amid C=O); 1600 s (arom. C=C); 1530 s (N-O); 1500 s (arom. C=C); 1450 w (C-H Def.); 1350 s (N-O); 1325 s; 1240 m (=C-O-C); 1175 m; 1095 m (=C-O-C); 1075 w, 1055 w, 1025 w, 970 w, 920 w (Aromaten); 860 m (1,4-disubstituierter Benzolring).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

2.42 (s, 3H, 2- CH_3); 4.62 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.28 (d, $J = 14$ Hz, 1H, p-Nitrobenzyl CH_2); 5.50 (d, $J = 14$ Hz, 1H, p-Nitrobenzyl CH_2); 5.99 (m, 2H, 5-H und 6-H); 7.20 (m, 6H, Phenyl und N-H); 7.65 (m, 2H, p-Nitrobenzyl); 8.28 (m, 2H, p-Nitrobenzyl).

UV-Spektrum in Ethanol:

$\lambda_{\text{max}} = 304 \text{ nm}$ ($\epsilon = 8800$).

9.11. Kaliumsalz der (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamido-
penem-3-carbonsäure (40)

Eine Suspension von 60 mg Palladium auf Aktivkohle in 0.5 ml

Essigester und 0.5 ml 0.1 molarer wäßriger KHCO_3 -Lösung wurde in der Spezialapparatur für kleine Mengen vorhydriert, bis kein Wasserstoff mehr verbraucht wurde (ca. 1 Stunde). Durch ein Septum wurde eine Lösung von 12 mg (0.025 mmol) (5R, 6R)-2-Methyl-6-phenoxyacetamidopenem-3-carbonsäure-p-nitrobenzylester (39) in 0.5 ml Essigester zugespritzt und nochmals 0.5 ml zum Nachspülen zugegeben. Danach wurde hydriert bis der Wasserstoffverbrauch abgeschlossen war (H_2 -Verbrauch: 2.24 ml = 4 Äquivalente). Das Palladium/Aktivkohle-Gemisch wurde mittels Glasfritte abfiltriert und mit 2 ml Essigester und 0.5 ml wäßriger 0.1 molarer KHCO_3 -Lösung gut gewaschen. Daraufhin wurde die wäßrige Phase sorgfältig abgetrennt und am Wasserstrahlvakuum von letzten Essigesterspuren befreit.

Zur Bestimmung der Konzentration wurden 30 μl der KHCO_3 -Lösung entnommen und für ein UV-Spektrum mit 3 ml Wasser verdünnt. Auf diese Weise ließ sich eine Ausbeute von 2.00 mg (24%) ermitteln.

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

2.38 (s, 3H, 2- CH_3); 4.57 (s, 2H, Phenoxy CH_2); 5.90 (m, 2H, 5-H und 6-H); 7.21 (m, 5H, Phenyl); 8.35 (breites s, 1H, N-H).

UV-Spektrum in Ethanol:

λ_{max} = 300 nm (ϵ = 5820).

10. Monobactamsynthese aus (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12)

10.1. N,N'-Di-[(2R, 5R, 6R)-1-aza-2-carboxymethyl-4-thia-3,3,6-trimethylbicyclo[3.2.0]heptyl]-harnstoff (45)

Zu 244 mg (1.00 mmol) (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12) in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden bei -20 °C unter Stickstoff zunächst 600 mg Dimethylaminopyridin gegeben und sodann 0.80 ml (3.70 mmol) 95 %-ige Chlorameisensäurebenzylester getropft. Nach 12-stündigem Stehen bei -18 °C war die Umsetzung, die dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde, abgeschlossen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Methylenchlorid verdünnt und nacheinander mehrmals mit 0.1n HCl und verdünnter NaHCO₃-Lösung geschüttelt. Die organische Phase wurde noch mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum eingedampft. Der gelbe semikristalline Rückstand wurde über 15 g Kieselgel chromatographiert, wobei als Fließmittelgemisch Toluol/Essigester (2:1) verwendet wurde. Dies lieferte 289 mg (56%) farblose Kristalle, welche mehrmals mit Ether gewaschen und dann im Hochvakuum getrocknet wurden. Das entstandene Harnstoffderivat (45) wies einen Schmelzpunkt von 170 °C auf.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3340 m (Amid C-H); 2900 m (aliph. C-H); 1775 s (β -Lactam C=O); 1760 s (Ester C=O); 1680 m (Harnstoff C=O); 1530 m (Amid II); 1440 w (C-H Def.); 1375 w, 1320 m (CH_3 Def.); 1220 s (=C-O-C); 1030 w (=C-O-C).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.43 (s, 6H, zwei 2- CH_3); 1.56 (s, 6H, zwei 2- CH_3); 1.79 (s, 6H, zwei 6-H); 3.75 (s, 6H, zwei Ester CH_3); 4.45 (s, 2H, zwei 3-H); 5.38 (s, 2H, zwei 5-H); 5.95 (s, 2H, zwei N-H).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{N}_4\text{S}_2$ (514.62)

Ber.	C	49.07	H	5.88	N	10.89	S	12.46 %
Gef.	C	48.87	H	5.95	N	10.86	S	12.46 %

10.2. (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillansäure-methylester (46)

Eine Lösung von 2.44 g (10.0 mmol) (6R)-6-Amino-6-methylpenicillansäuremethylester (12) in 20 ml Acetonitril und 5 ml Wasser wurde unter Rühren bei 0 °C mit 0.87 ml (6.00 mmol) Chlorameisensäurebenzylester versetzt. Dazu tropfte man nun unter denselben Bedingungen weitere 0.87 ml (6.00 mmol) Chlorameisensäurebenzylester und gleichzeitig eine Lösung von 1.06 g (10.0 mmol) Na_2CO_3 in 5 ml Wasser. Nach 30-minütigem Rühren bei 0 °C wurden 100 ml gesättigte NaCl-

Lösung zugegeben und das Reaktionsgemisch mehrmals mit Methylenchlorid extrahiert. Diese organische Phase wiederum wurde mehrmals mit verdünnter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt und zum Schluß mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum entstandene Rückstand wurde über 100 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (4:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt. Daraus resultierten 3.52 g (93%) eines farblosen Öls.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3450 m (Amid N-H); 3100 w (arom. C-H); 2960 w (aliph. C-H); 1780 s (β -Lactam C=O); 1760 s, 1740 s (Ester C=O); 1520 s (Amid II); 1455 m (C-H Def.); 1405 w; 1385 w (CH_3 Def.); 1320 m; 1225 s (=C-O-C); 1190 w, 1165 w, 1145 w, 1095 w (Aromaten); 1075 s (=C-O-C); 1030 m, 1010 w, 950 w (Aromaten).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.45 (s, 3H, 2- CH_3); 1.54 (s, 3H, 2- CH_3); 1.78 (s, 3H, 6- CH_3); 3.65 (s, 3H, Ester CH_3); 4.36 (s, 1H, 3-H); 5.05 (s, 2H, Benzyl CH_2); 5.26 (s, 1H, 5-H); 5.58 (s, 1H, N-H); 7.25 (s, 5H, Phenyl).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ (378.45)

Ber.	C	57.13	H	5.86	N	7.40	S	8.47 %
Gef.	C	57.28	H	6.06	N	7.38	S	8.47 %

10.3. (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillan-
säuremethylester-S-dioxid (47)

Zu einer Lösung von 3.78 g (10.0 mmol) (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillansäuremethylester (46) in 50 ml absolutem Methylenchlorid wurden unter Rühren bei -10°C spatelweise 9.60 g (54.0 mmol) 85 %-ige m-Chlorperbenzoesäure zugegeben. Nach 3-stündigem Rühren bei -10°C wurde mit methylenchlorid verdünnt und je zweimal mit NaHCO_3 -Lösung und 10 %-iger NaHSO_3 -Lösung und anschließend wieder mit NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Zum Schluß wurde die organische Phase mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Aus dem Filtrat erhielt man nach dem Eindampfen im Vakuum analysenreine, farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 152°C - 153°C , die nur noch mit Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet worden waren. Die Mutterlauge wurde über 16 g Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch von Toluol/Essigester (4:1) chromatographiert. Daraus resultierten nochmals farblose Kristalle mit demselben Schmelzpunkt. Die Gesamtausbeute der Reaktion betrug 3.40 g (83%).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3380 m (Amid N-H); 2940 w (aliph. C-H); 1810 s (β -Lactam C=O); 1775 s, 1735 s (Ester C=O); 1510 s (Amid C=O); 1445 m (C-H Def.); 1398 w; 1380 w (CH_3 Def.); 1340 s; 1230 s (=C-O-C); 1185 m, 1160 w, 1125 s, 1085 m (Aromaten); 1065 m (=C-O-C); 1020 w, 948 w (Aromaten).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.36 (s, 3H, 2- CH_3); 1.53 (s, 3H, 2- CH_3); 1.85 (s, 3H, 6- CH_3);
3.73 (s, 3H, Ester CH_3); 4.45 (s, 1H, 3-H); 4.55 (s, 1H,
5-H); 5.09 (s, 2H, Benzyl CH_2); 5.73 (s, 1H, N-H unscharf);
7.27 (s, 5H, Phenyl).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$ (410.45)

Ber.	C	52.67	H	5.40	N	6.83	S	7.81 %
Gef.	C	52.67	H	5.45	N	6.68	S	7.78 %

10.4. 2-[(3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methyl-
sulfonylazetidin-2-onyl]-2-methylbut-2-ensäuremethyl-
ester (49)

Zu einer Lösung von 3.07 g (7.48 mmol) (6R)-6-Benzoxycarbonylamino-6-methylpenicillansäuremethylester-S-dioxid (47) in 15 ml absolutem Tetrahydrofuran wurden unter Argon bei -30°C innerhalb von 5 Minuten unter Rühren 1.65 ml = 1.68 g (11.0 mmol) DBU zugetropft. Nach 30-minütigem Nachrühren bei Raumtemperatur zeigte das Dünnschichtchromatogramm kein Ausgangsmaterial mehr an. Nur noch ein UV-aktiver Fleck war auf der Startlinie vorhanden. Nun wurden langsam bei -30°C 748 μl = 1.71 g (12.0 mmol) Methyljodid zugetropft und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit Methylenchlorid verdünnt und mehrmals mit 1N HCl ausgeschüttelt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewa-

schen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Das Eindampfen des Filtrates im Vakuum lieferte einen instabilen Schaum, der über 138 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt werden konnte. Dies ergab 2.72 g (86%) eines farblosen, amorphen Feststoffes.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 2980 w (aliph. C-H); 1800 s (β -Lactam C=O); 1745 s, 1725 m (br., Ester C=O); 1645 w (arom. C=C); 1520 m (Amid II); 1445 w (C-H Def.); 1390 w, 1375 w (CH_3 Def.); 1330 m; 1230 s (=C-O-C); 1150 m, 1120 w, 1095 w (Aromaten); 1075 m (=C-O-C); 1040 w, 968 w (Aromaten).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.84 (s, 3H, 3- CH_3); 2.10 (s, 3H, Vinyl CH_3); 2.19 (s, 3H, Vinyl CH_3); 2.70 (s, 3H, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$); 3.70 (s, 3H, Ester CH_3); 4.80 (s, 1H, 4-H); 5.05 (s, 2H, Benzyl CH_2); 5.78 (breites s, 1H, N-H); 7.25 (s, 5H, Phenyl).

10.5. (3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methylsulfonylazetidin-2-on (51)

Durch eine Lösung von 2.00 g (4.70 mmol) 2-[(3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methylsulfonylazetidin-2-onyl]-2-methylbut-2-ensäuremethylester (49) in 100 ml Methanol wur-

de bei -30°C 8 Stunden lang mit einer Einleitungsfritte Ozon eingeleitet. Das Eindampfen des Methanols im Vakuum, bei kaltem Wasserbad, lieferte einen farblosen, öligen Rückstand. Dieser wurde in Methylenchlorid aufgenommen, zweimal mit 10 %-iger NaHSO_3 -Lösung ausgeschüttelt und anschließend mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das nach dem Eindampfen des Filtrates erhaltene Rohprodukt wurde über 80 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (2:1) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt, wobei durch Hydrolyse auf der Säule erst das letztlich gewünschte Produkt entstand. Nach dem Trocknen im Hochvakuum verblieben 1.12 g (76%) eines farblosen, amorphen Feststoffes.

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 w (Amid N-H); 3055 w (arom. C-H); 2975 w (aliph. C-H); 1820 s (β -Lactam C=O); 1745 s (Ester C=O); 1610 w (arom. C=C); 1520 s (Amid II); 1425 w (C-H Def.); 1380 w (CH_3 Def.); 1325 s, 1230 m (Aromaten); 1150 s (=C-O-C); 1135 w; 1065 s (=C-O-C); 978 w, 900 w (Aromaten).

^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 (ppm):

1.82 (s, 3H, 3-CH_3); 2.83 (s, 3H, SO_2CH_3); 4.45 (s, 1H, 4-H); 5.05 (s, 2H, Benzyl CH_2); 5.90 (s, 1H, N-H br.); 7.27 (s, 6H, Phenyl und N-H).

$C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312.35)

Ber.	C	49.99	H	5.16	N	8.97	S	10.27 %
Gef.	C	50.05	H	5.29	N	8.89	S	10.31 %

10.6. (3R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methylazetidin-2-on (52)

Unter Erwärmen wurden 312 mg (1.00 mmol) (3R, 4R)-3-Benzoxycarbonylamino-3-methyl-4-methylsulfonylazetidin-2-on (51) in einem Gemisch aus 16 ml Isopropanol und 32 ml Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurden unter kräftigem Rühren spatelweise 950 mg (25.0 mmol) Natriumborhydrid zugesetzt und eineinhalb Stunden bei 0 °C nachgerührt, mit Methylenchlorid verdünnt, die organische Phase mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und zum Schluß über $MgSO_4$ getrocknet. Der nach dem Eindampfen des Filtrates im Vakuum verbliebene Rückstand konnte über 10 g Kieselgel mit Toluol/Essigester (1:2) als Fließmittelgemisch chromatographisch gereinigt werden. Die resultierenden Kristalle ließen sich leicht aus Isopropanol/Hexan umkristallisieren. Die Ausbeute an farblosen, im Hochvakuum getrockneten Kristallen mit einem Schmelzpunkt von 92 °C - 93 °C betrug 196.6 mg (84%).

IR-Spektrum in CH_2Cl_2 (cm^{-1}):

3400 m (Amid N-H); 3000 w (arom. C-H); 2950 w (aliph. C-H); 1795 s (β -Lactam C=O); 1740 s (Ester C=O); 1510 s (Amid II);

1460 w (C-H Def.); 1395 w (CH₃ Def.); 1340 w, 1290 m, 1270 m (Aromaten); 1250 m (=C-O-C); 1190 s; 1085 s (=C-O-C); 1030 w, 980 w, 970 w, 948 w, 918 w (Aromaten).

¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ (ppm):

1.48 (s, 3H, 3-CH₃); 3.10 (d, J = 6 Hz, 1H, 4-H); 3.63 (d, J = 6 Hz, 1H, 4-H); 5.03 (s, 2H, Benzyl CH₂); 5.78 (br. s, 1H, Amid N-H); 6.63 (br. s, 1H, Amid N-H des β-Lactams); 7.20 (s, 5H, Phenyl).

C₁₂H₁₄O₃N₂ (234.26)

Ber.	C	61.53	H	6.02	N	11.96 %
------	---	-------	---	------	---	---------

Gef.	C	61.12	H	6.13	N	11.97 %
------	---	-------	---	------	---	---------

11. Zusammenfassung

Von Strominger et al. wurde eine verbesserte Wirkung der β -Lactamantibiotika durch Einführung eines 6β -Methyl-Substituenten vorausgesagt. Diese Wirkung konnte bei Penicillinen, Cephalosporinen und Monobactamen von anderen Autoren nicht nachgewiesen werden. Die entsprechenden β -Methyl-derivate waren durchwegs weitaus weniger wirksam als die Mutterverbindungen oder sogar völlig unwirksam.

In dieser Arbeit findet die Strominger-Theorie erstmals eine experimentelle Bestätigung:

Beim Penemsystem gelangt man durch die Einführung einer β -Methylgruppe zu einem verbesserten Hemmstoff, der überdies auch eine höhere β -Lactamasestabilität zeigt.

Trotzdem ist die Wirksamkeit des Zielmoleküls mit etwa derjenigen kommerzieller Antibiotika oder derjenigen der 6-Hydroxyethylpeneme bei weitem nicht vergleichbar. Auch nach der Einführung der "Strominger-Methylgruppe" bleiben die Phenoxyacetamidopeneme eine zu reaktive und hydrolyseempfindliche Stoffklasse!

Die Synthese und Untersuchung der Zielverbindung haben aber auch gezeigt, daß 6,6-disubstituierte Derivate antibakteriell wirksam sein können. Obwohl das Penem-Grundgerüst schon hundertfache Veränderungen durch Substituenten erfahren hat, ist die Titelverbindung das erste antibakteriell wirksame 6,6-disubstituierte Penem-Derivat.

12. Literaturverzeichnis

1. A. Geigges in "Bild der Wissenschaft" 4, 104 (1978).
2. Übersicht: E. P. Abraham in "Spektrum der Wissenschaft" 8, 47 (1981).
3. C. M. Cimarusti, J. Med. Chem. 27, 247 (1984).
4. β -Lactamasen und β -Lactamasestabilität-Übersicht:
J. - C. Pechère, R. Levesque, J. Antimicrob. Chemo-
ther. 12, 529 (1983).
5. Resistenz-Übersichten:
a) R. Schmitt, Naturwiss. Rundsch. 35, 139 (1982).
b) r. Slack, J. Antimicrob. Chemother. 13, 526 (1984).
6. J. L. Strominger in Ref. 197, 705 in "Cephalosporins
and Penicillins: Chemistry and Biology", E. H. Flynn,
Ed., Academic Press, New York, N. Y., 470 (1972).
7. D. J. Tipper, J. L. Strominger in Ref. 204, 1133 in
"Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology",
E. H. Flynn, Ed., Academic Press, New York, N. Y.,
472 (1972).

8. R. B. Woodward in Ref. 31, 440 in "Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology", E. H. Flynn, Ed., Academic Press, New York, N. Y., 303 (1972).
9. R.B. Morin, B. G. Jackson, R. A. Mueller, E. R. Lavagnino, W. B. Scanlon, S. L. Andrews, J. Amer. Chem. Soc. 91, 1401 (1969).
10. P. H. Milner, A. W. Guest, F. P. Harington, P. J. Ponsford, T. C. Smale, A. V. Stachulski, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1984, 1337.
11. J. Ernest, J. Gosteli, C. W. Greengras, W. Holick, D. E. Jackman, H. R. Pfaendler, R. B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 100, 8214 (1978).
12. M. Lang, K. Prasad, W. Holick, J. Gosteli, J. Ernest, R. B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 101, 6296 (1979).
13. H. R. Pfaendler, J. Gosteli, R. B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 102, 2039 (1980).
14. R. Reiner, P. Zeller, Helv. Chim. Acta 51, 1905 (1968).
15. J. L. Strominger, D. J. Tipper in Ref. 81, 701 in "Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology", E. H. Flynn, Ed., Academic Press, New York, N. Y.,

540 (1972).

16. "Handbook of Chemistry and Physics", 60. Edition,
CRC Press, D-1 (1979 - 1980).
17. "Preparative Procedures (Appendix)" in "Cephalosporins
and Penicillins: CHEMISTRY and Biology", E. H. Flynn,
Ed., Academic Press, New York, N. Y., 667 (1972).
18. A. Imada, K. Kitano, K. Kintaka, M. Muroi, M. Asai,
Nature (London) 289, 590 (1981).
19. R. B. Sykes, C. M. Cimarusti, D. P. Bonner, K. Bush,
M. Floyd, N. H. Georgopapadakou, W. H. Koster, W. C.
Liu, W. L. Parker, P. A. Principe, M. L. Rathnum,
W. A. Slusarchyk, W. H. Trejo, J. S. Wells, Nature
(London) 291, 489 (1981).
20. C. M. Cimarusti, R. B. Sykes, Medicinal Research
Reviews, Vol. 4, Nr. 1, 1 (1984).
21. P. Proctor, N. P. Gesmantel, M. J. Page, J. Chem.
Soc. (Perkin Trans.) 2, 1185 (1982).
22. C. M. Cimarusti, D. P. Bonner, H. Breuer, H. W. Chang,
A. W. Fritz, D. M. Floyd, T. P. Kissick, W. H. Koster,
D. Kronenthal, F. Massa, R. H. Mueller, J. Plussec,

- W. A. Slusarchyk, R. B. Sykes, M. Taylor, E. R. Weaver, Tetrahedron 39, Nr 15, 2577 (1983).
23. T. Hirose, J. Nakano, H. Uno, Yakugaku, Zasshi 103 (11), 1210 (1983).
24. S. Wolfe, A. L. Demain, S. E. Jensen, D. W. S. Westlake, Science 229, 1386 (1984).

Lebenslauf

Geburtsdatum: 1. Feb. 1957

Geburtsort: Trostberg

Eltern: Franz Blaschek, Verwaltungsamtsrat
Waltraud Blaschek, geb. Gruber

Familienstand: verheiratet seit 6. Dez. 1982

Schulbesuch: 1963 - 1967 Heinrich-Braun-Schule,
Trostberg
1967 - 1976 Hertzthaimer-Gymnasium,
Trostberg
Juni 1976 Abitur

Studium: 1976 - 1981 Chemiestudium an der Ludwig-
Maximilians-Universität
München
Nov. 1979 Diplomchemiker-Vorprüfung
Juli 1981 Mündliche Diplomprüfung
Okt. 1981 - Anfertigung einer Diplomarbeit
Juli 1982 unter Anleitung von Prof. Dr.
J. Mulzer am Institut für Or-
ganische Chemie der Universi-
tät München
Nov. 1982 - Anfertigung einer Doktorarbeit
Nov. 1986 unter Anleitung von Prof. Dr.
H.-R. Pfaendler am Institut für
Organische Chemie der Universi-
tät München

Beruflicher seit Nov. 1982 Anstellung als vollbe-

Werdegang: schäftigte wissenschaft-
liche Hilfskraft.

